

Individuelle Vorhersage des Chemotherapieansprechens mittels *in-vitro* Chemosensibilitätstestung bei Patienten mit Chronischer Lymphatischer Leukämie

RABEA LUBE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

und

dem Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie
Klinik I für Innere Medizin
Klinikum der Universität zu Köln
Betreuer: Prof. Dr. T. Schinköthe

**Individuelle Vorhersage des Chemotherapieansprechens
mittels *in-vitro* Chemosensibilitätstestung bei Patienten
mit Chronischer Lymphatischer Leukämie**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr.med.vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

eingereicht von

RABEA LUBE

Tierärztin aus Köln

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. A. Moritz
Prof. Dr. T. Schinköthe

Tag der Disputation: 27.04.2007

**Für meine Eltern
in tiefer Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Tumorerkrankungen	2
2.2 Zytostatische Chemotherapie.....	4
2.2.1 Wirkungsweise von Zytostatika	4
2.2.2 Nebenwirkungen von Zytostatika	5
2.2.3 Zytostatikaeinteilung	6
2.2.4 Zytostatikaresistenz	12
2.3 In-vitro Chemosensibilitätstests	15
2.3.1 DiSC-Assay	16
2.3.2 Auswertungsverfahren.....	17
2.3.3 In-vivo / in-vitro Korrelation	18
2.4 Chronische lymphatische Leukämie beim Mensch	19
2.4.1 Epidemiologie	20
2.4.2 Ätiologie und Pathogenese.....	20
2.4.3 Klinische Symptome	21
2.4.4 Diagnostik	22
2.4.5 Prognose	24
2.4.6 Therapie.....	25
2.5 Chronische lymphatische Leukämie beim Hund	29
2.5.1 Epidemiologie	30
2.5.2 Klinische Symptome	30
2.5.3 Diagnostik	31
2.5.4 Prognose	32
2.5.5 Therapie.....	32
3. Zielsetzung	35
4. Material und Methoden	36
4.1 Material	36
4.1.1 Patientenmaterial.....	36

4.1.2	Entenblut	37
4.1.3	Zytostatika	37
4.1.4	Lösungen	38
4.2	Methoden	39
4.2.1	Separation mononukleärer Zellen	39
4.2.2	Herstellung einer Entenerythrozyten (DRBC)-Stocklösung	39
4.2.3	Herstellung von Zytostatikalösungen	39
4.2.4	Herstellung kollagenbeschichteter Objektträger	40
4.2.5	Gegenfärbung nach Pappenheim	41
4.2.6	Differential Staining Cytotoxicity (DiSC) Assay	41
4.3	Statistische Methoden	43
4.3.1	Auswertungen des DiSC Assay	43
4.3.2	Verwendete statistische Tests	47
4.4	Erfassung der therapeutischen Effektivität	49
5.	Ergebnisse	51
5.1	Deskriptive Statistik	51
5.1.1	Probenaufkommen	51
5.1.2	Patientenkollektiv	52
5.1.3	Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben	54
5.2	Chemosensibilitätsindex C_i	55
5.2.1	Eichung	55
5.2.2	Berechnung	56
5.3	<i>In-vitro</i> / <i>in-vivo</i> Korrelation	58
5.3.1	Vergleich: „resistent“ versus „sensibel“	58
5.3.2	Klinische Korrelation	63
5.3.3	Vergleich Fludarabin und Bendamustin	65
5.4	Sensibilität von Bendamustin	67
5.5	Blutdiagnostische Auswertung	69
5.5.1	Patientenwerte	69
5.5.2	Testtauglichkeit	73
5.5.3	Klinische Korrelation	75
5.6	AUC Daten Auswertung	78
5.6.1	Gesamtverteilung	78
5.6.2	Sensibilität Chlorambucil	80

6. Diskussion	82
6.1 <i>In-vivo / in-vitro</i> Korrelation	83
6.1.1 Vergleich Fludarabin und Bendamustin.....	85
6.2 Chemosensibilitätsindex C_i.....	86
6.3 Sensibilität von Bendamustin	87
6.4 Blutdiagnostik	88
6.5 AUC Daten Auswertung.....	91
6.5.1 Sensibilität Chlorambucil	91
6.6 Patienten	91
6.7 Ausblick.....	93
6.8 Übertragbarkeit und Anwendung beim Hund.....	94
7. Zusammenfassung.....	95
8. Summary.....	96
9. Literaturverzeichnis	97
10. Anhang.....	109

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
2-cda	Cladribin
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
AUC	Area under the curve; Fläche unter der Kurve
AUROC	Fläche unter der Receiver Operating Characteristics Kurve
Benda	Bendamustin
bzw.	beziehungsweise
C _i	Chemosensibilitätsindex
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cm	Zentimeter
CR	komplette Remission
DC	tote Zellen
DHAD	Mitoxantron
DiSC	Differential Staining Cytotoxicity
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRBC	Entenerythrozyten (Duck Red Blood Cell)
et al.	et alii: und weitere
Fa.	Firma
FC	Fludarabin+Cyclophosphamid
FKS	Fötales Kälberserum
FluCam	Fludarabin + Antikörper Alemtuzumab
Flud	Fludarabin
Hrsg	Herausgeber
I.E.	Internationale Einheiten
i.v.	intravenös
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LGL	Large granular lymphocytes
MDR	Multidrug Resistance
mg	Milligramm
ml	Milliliter

n	Anzahl
NC	no change, stabiler Krankheitsverlauf
NCI	amerikanisches nationales Krebsinstitut
p	p-Wert
PD	Progression
p.o.	per os
PR	Partielle Remission
Pred	Prednison
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
ROC	Receiver Operating Characteristics
s.c.	subcutan
SD	stable disease: stabiler Krankheitsverlauf
Tab.	Tabelle
TCS	Tumorzellüberleben (Tumor cell survival)
Tk	Thymidinkinase
U/l	Unit proLiter
u.a.	und andere
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Upm	Umdrehungen pro Minute
VC	vitale Zellen der normalen Hämatopoese
VCR	Vincristin
VTC	vitale Tumorzellen
WiSP	Wissenschaftlicher Service Pharma GmbH

1. Einleitung

Hämatopoetische Neoplasien gehören sowohl beim Menschen als auch beim Hund zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Bei der Therapie dieser Erkrankungen hat die zytostatische Chemotherapie nach wie vor die größte Bedeutung. Leider schlägt aber bei einer Großzahl an Patienten die Therapie aufgrund einer Resistenz gegen das eingesetzte Chemotherapeutikum nicht an, da jeder Mensch und jedes Tier ein individuelles Chemosensitivitätsprofil aufweist. Um solche wirkungslosen Behandlungen zu vermeiden, wurden *in-vitro* Chemosensibilitätstestungen entwickelt. Mit deren Hilfe soll, vergleichbar mit der Resistenztestung im Antibiogramm bei bakteriellen Infektionen, für jeden individuellen Patienten festgestellt werden, welches Zytostatikum erfolgreich sein wird. Innerhalb dieser Arbeit wird eine solche *in-vitro* Testung bei Humanpatienten mit chronischer lymphatischer Leukämie durchgeführt.

Zunächst wird in der Literaturübersicht näher auf die Möglichkeiten der zytostatischen Chemotherapie eingegangen, bevor die *in-vitro* Chemosensibilitätstests erläutert werden. Anschließend folgt eine Beschreibung der chronischen lymphatischen Leukämie sowohl beim Menschen als auch beim Hund. Nach dieser Grundlagenerläuterung folgt dann im Kapitel Zielsetzung eine genauere Schilderung der Aufgabenstellung.

2. Literaturübersicht

2.1 Tumorerkrankungen

Die Anzahl an Tumorerkrankungen beim Menschen hat im letzten Jahrhundert deutlich zugenommen. Zur Zeit werden in Deutschland pro Jahr ca. 400.000 Erstdiagnosen einer Tumorerkrankung gestellt (Deutsches-Krebsforschungszentrum, 2005). Auch der Anteil der Todesfälle, die auf eine Krebserkrankung zurückzuführen sind, hat stetig zugenommen und macht heutzutage ca. 30 % aller Todesfälle aus. Als Hauptgrund für diesen Anstieg wird, da bösartige Tumore zumeist Erkrankungen des höheren Lebensalters sind, die kontinuierliche Zunahme des Anteils älterer Menschen an der Bevölkerung angenommen (Robert-Koch-Institut, 2006).

Als Ursache der Krebserkrankungen wird ein multifaktorieller Prozess angesehen, der sowohl aus körpereigenen als auch aus externen Komponenten besteht (Hiddemann, Huber et al., 2004).

Auch in den Tierarztpraxen werden immer mehr Hunde und Katzen mit Tumorerkrankungen vorgestellt. Hierfür sind neben einer möglichen Veränderung in der Haustierpopulation vor allem ein verändertes Bewusstsein der Besitzer und das zunehmende Wissen und Möglichkeiten in Diagnostik und Therapie der Tierärzte verantwortlich.

Die altersangepasste Tumorinzidenz bei Hunden und Katzen ist mit den Zahlen beim Menschen vergleichbar (Misdorp, 2005). Nach einer Studie aus den USA erkrankten pro 100.000 Individuen 330 Menschen, 213 Hunde und 264 Katzen an Krebs (Schneider, 1976). Mehrere Studien haben Tumore als die häufigste Todesursache bei Hunden identifiziert (Bronzon 1982, Bernardi 1988, Bredal et al. 1994, Bonnett et al. 1997, Dobson et al 2002). Untersuchungen aus Schweden zeigten, dass ca. 18 % der Hunde aufgrund eines Tumors versterben (Bonnett, Egenvall et al., 2005). Beachtlich ist auch, dass die Tumorfrequenz bei den verschiedenen Hunderassen sehr unterschiedlich ist. Ein besonders hohes Risiko gibt es beim Boxer, Berner Sennenhund und dem Golden Retriever. Hingegen gering ist das Risiko beim Dackel und beim Cavalier King Charles Spaniel (Egenvall, Bonnett et al., 2005). Die Tumorart mit der höchsten Mortalitätsrate ist das Lymphosarkom, gefolgt vom Mamma-, Leber- und Lungentumor (Bonnett, Egenvall et al., 2005). Das Lymphosarkom bzw. maligne Lymphom der Hunde entspricht im klinischen Verhalten und Symptomatik weitgehend dem Non-Hodgkin-Lymphom beim Menschen (Teske, 2005).

Durch bedeutende Fortschritte in der Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen ist es gelungen, dass Krebs heutzutage mit wenigen Ausnahmen eine behandelbare Erkrankung

geworden ist. Die Sterblichkeitsraten gehen beim Menschen seit den 90er Jahren zurück (Hiddemann, Huber et al., 2004).

Als Therapieoptionen stehen bei lokalisierten Tumoren chirurgische Entfernung und Strahlentherapie im Mittelpunkt, bei disseminierten Tumoren, bei Metastasen und ausgedehnten Rezidiven hingegen ist die Tumorchemotherapie von besonderer Bedeutung (Hiddemann, Huber et al., 2004).

2.2 Zytostatische Chemotherapie

Die Entwicklung antineoplastischer Chemotherapeutika ist einer der Meilensteine in der Geschichte der Medizin (Kessler, 2005). Obwohl die Anwendung zytostatischer Chemotherapie verhältnismäßig neu ist, so hat sie dennoch in den letzten Jahren am meisten zu den Fortschritten in der Tumorthherapie beigetragen. Als erstes Zytostatikum wurde 1942 ein Stickstoff-Lost-Derivat verwendet. Eine Therapie einer akuten lymphatischen Leukämie beim Kind wurde 1948 zum ersten mal mit dem Folsäure-Antagonisten Aminopterin durchgeführt (Aktories und Unger, 2005).

Trotz beachtlicher Fortschritte in der Tumorchemotherapie ist eine kurative Behandlung mit einer Heilung bzw. einer deutliche Verlängerung der Überlebenszeit durch Anwendung von Zytostatika nur bei 10 % aller Neoplasien möglich. Oftmals wird durch die Chemotherapie nur eine Teilremission, eine Linderung tumorbedingter Symptome und eine begrenzte Lebenszeitverlängerung erreicht. Dies ist bei ca. 70 % aller Neoplasien der Fall und wird als palliative Chemotherapie bezeichnet. Nicht durch eine Chemotherapie beeinflussbar sind ca. 20 % aller Neoplasien. Dabei handelt es sich zumeist um metastasierende Tumore.

Die Chemotherapie hat auch eine große Bedeutung nach einer erfolgreichen chirurgischen Entfernung eines Tumors, um restliche Tumorzellen zu eliminieren. Diese Form wird als adjuvante Chemotherapie bezeichnet. Von einer neoadjuvanten Chemotherapie wird gesprochen, wenn Zytostatika vor dem chirurgischen Eingriff gegeben werden, um die Chancen einer radikalen Operation zu verbessern (Aktories und Unger, 2005; Pirker, 2004).

Auch in der Veterinärmedizin werden zunehmend Chemotherapeutika zur Behandlung neoplastischer Erkrankungen eingesetzt. Im Unterschied zum Menschen wird beim Tier durch die zytostatische Behandlung jedoch selten eine Heilung herbeigeführt. In der Veterinärmedizin steht eine palliative Therapie mit einer Lebensverlängerung bei guter Lebensqualität im Vordergrund (Kessler, 2005).

2.2.1 Wirkungsweise von Zytostatika

Zytostatika führen zur Elimination von Tumorzellen, indem sie das Zellwachstum bzw. den Zellmetabolismus hemmen und dadurch die Zellen zum Absterben bringen. Diesen Effekt erzielen sie u.a., indem sie DNA-, RNA- oder Proteinsynthese bzw. die Funktion von Proteinen beeinflussen. Sie bewirken dadurch sowohl eine Hemmung der Zellvermehrung als auch eine Nekrose oder Apoptose der Tumorzellen (Pirker, 2004).

Die meisten Chemotherapeutika wirken besonders gut auf proliferierende Zellen. Außerhalb der Proliferationsphase, in der sogenannten G₀-Phase, sind die Zellen hingegen meistens unempfindlich. Deshalb werden zwei Gruppen von Chemotherapeutika unterschieden.

Erstens die Gruppe der Zytostatika, welche zellphasenspezifisch wirken. Hierzu gehören die meisten Antimetaboliten und Mitosehemmstoffe. Die Antimetaboliten, welche die Synthese von DNA-Bausteinen hemmen, wirken in der Phase der DNA-Synthese, während z.B. die Vinca-Alkaloide und Taxane in der Metaphase während der Zellteilung wirksam sind.

Zu der zweiten Gruppe mit den zellphasenunspezifischen Zytostatika gehören Anthrazykline, Alkylantien und Cisplatin. Aber auch diese Gruppe zeigt eine größere Effektivität während der Wachstumsphase (Aktories und Unger, 2005).

Für die Effektivität der zytostatischen Chemotherapie sind neben dem unmittelbaren Wirkmechanismus vor allem das Wachstumsverhalten des Tumors, pharmakokinetische Eigenschaften der Zytostatika, Tumordurchblutung, Diffusion der Zytostatika in den Tumor und die zellulären Resistenzmechanismen von wesentlicher Bedeutung. Auch Interaktionen mit anderen Zytostatika oder anderen Medikamenten sind bekannt (Pirker, 2004).

2.2.2 Nebenwirkungen von Zytostatika

Zytostatika weisen eine Vielzahl von zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Deshalb ist die zytostatische Chemotherapie immer eine Balance zwischen Antitumorwirkung und Nebenwirkungen (Pirker, 2004).

Das Nebenwirkungspotential von Zytostatika wird hauptsächlich durch eine Reproduktionshemmung schnell proliferierender Gewebe, wie des hämatopoetischen Systems, der Haut, der Schleimhaut und des Keimepithels bestimmt. Besonders die Myelosuppression mit Leukopenie und nachfolgender Thrombozytopenie und Anämie limitiert häufig die Therapie mit Zytostatika (Kroker, 1999).

Das Ausmaß der Nebenwirkungen ist sowohl von der Art, Dosis und Dauer der Chemotherapie als auch von Patientenfaktoren, wie der Funktionalität der Organe und eventuellen Vorbehandlungen abhängig.

Akute Nebenwirkungen umfassen allergische Reaktionen, Nausea, Emesis, Fieber, Nephrotoxizität, Hepatotoxizität, akute Kardiotoxizität und das Tumorlysesyndrom.

Subakute Nebenwirkungen sind Nausea und Emesis, Myelotoxizität, Nekrosen durch Paraversate, Haut- und Schleimhauttoxizitäten (Alopezie, Diarrhöe, Schmerzen, Resorptionsstörungen) und Nebenwirkungen auf Keimdrüsen.

Chronische Nebenwirkungen umfassen Kardiotoxizität, Lungenfibrose, Neurotoxizität, Ototoxizität und mutagene (karzinogene, teratogene) Wirkungen (Pirker, 2004).

Aufgrund der hauptsächlichen Anwendung der Chemotherapie in der Veterinärmedizin als Palliation sind die gebräuchlichen Dosierungen der Zytostatika so gewählt, dass Nebenwirkungen seltener als beim Menschen sind. Dennoch können aber auch hier unerwünschte Nebenwirkungen und Toxizitäten auftreten (Ruslander, 2005). So zeigen ca. 10-20 % der Patienten toxische Erscheinungen (Hirschberger, 2001). Die beim Tier am häufigsten beobachteten Nebenwirkungen sind Myelosuppression, gastrointestinale Toxizität, Kardiotoxizität, Nephrotoxizität, hämorrhagische Zystitis, Aloplezie, Hyperpigmentation, Neurotoxizität, Anaphylaxie und Extravasation (Nagel, 2003).

2.2.3 Zytostatikaeinteilung

Die therapeutisch gebräuchlichen Zytostatika gehören chemischen sehr unterschiedlichen Substanzklassen an. Die zytostatische Wirkungsweise beruht auf sehr verschiedenen Interferenzen mit dem Zellstoffwechsel.

Derzeit stehen mehr als 60 Zytostatika im klinischem Einsatz und eine große Anzahl von neuen Substanzen wird getestet (Pirker, 2004). Dieses Kapitel gibt deshalb nur einen Überblick über die wichtigsten Zytostatikagruppen. Es wird nur auf die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika näher eingegangen.

Alkylierende Substanzen

Die Verbindungen dieser Substanzgruppe sind chemisch instabil und übertragen Alkyl-Reste. So findet ein Transfer an DNA-Basen, RNA und Proteinen statt. Dadurch kommt es zu einer Vernetzung und in Folge zu einer Hemmung und Störung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese. Aus dieser DNA-Veränderung ergeben sich aber auch kanzerogene und teratogene Wirkungen (Aktories und Unger, 2005).

Chlorambucil

Dieses Stickstoff-Lost Derivat führt durch bifunktionelle Alkylierung zu DNA-Quervernetzungen. Chlorambucil wird oral verabreicht. Eine enzymatische Aktivierung in der Leber ist nicht notwendig. Angewendet wird es vor allem bei der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie und Lymphomen. Dosislimitierend ist die Knochenmarksuppression (Aktories und Unger, 2005; Keilholz, Knoth et al., 2006).

Tabelle 2.1: Wichtigsten Vertreter der Alkylierenden Substanzen*Quelle: Modifiziert nach Aktories und Unger (2005)*

Alkylierende Substanzgruppen	Vertreter
Stickstoff-Lost-Derivate	Chlorambucil, Cyclophosphamid, Bendamustin, Melphalan, Ifosfamid, Trofosfamid
Nitrosoharnstoffe	Carmustin, Lomustin, Streptozotocin
Alkylsulfonate	Busulfan
Triazine	Darcarbacin
Äthylenimine	Thio-TEPA, Hexaethylmelanin

Cyclophosphamid

Cyclophosphamid, das ein Oxazaphosphorin darstellt, muss nach oraler oder venöser Verabreichung erst in der Leber metabolisch aktiviert werden. Dies erfolgt durch Hydroxylierung zu 4-Hydroxy-Cyclophosphamid, das mit der ringoffenen Form Aldophosphamid im Gleichgewicht steht. Nachdem die Metaboliten über das Blut zum eigentlichen Wirkort (Tumor) gelangt sind, findet dort eine nicht-enzymatische Spaltung in Acrolein und das eigentliche alkylierende Agens Chlorethylphosphorsäureamid statt (Aktories und Unger, 2005).

Cyclophosphamid wird bei vielen Indikationen eingesetzt (Malignomen, Leukämien, Autoimmunerkrankungen) und ist oft Bestandteil von Kombinationschemotherapien (Pirker, 2004).

Dosislimitierend ist die Myelosuppression, wobei in erster Linie Granulo- und Lymphopoese betroffen sind. Häufig kommt es zu Nausea, Emesis und Alopezie. Durch die urotoxische Wirkung (Acrolein) kann eine hämorrhagische Cystitis entstehen. In hohen Dosen wirkt Cyclophosphamid auch kardiotoxisch. (Keilholz, Knoth et al., 2006)

Bendamustin

Bendamustin wurde in der früheren DDR entwickelt und wird deshalb in Deutschland relativ häufig angewendet. Chemisch ist es dem Chlorambucil sehr ähnlich, im Gegensatz zu diesem aber wasserlöslich. Die optimale Dosierung für die Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie wurde erst vor kurzem ermittelt (Lissitchkov, Arnaudov et al., 2006). Des

Weiteren wird Bendamustin vorwiegend bei soliden Tumoren und bei Lymphomen eingesetzt (Hallek und Emmerich, 2006). Dosislimitierend sind die zum Teil lang anhaltenden Knochenmarksuppressionen und gastrointestinalen Nebenwirkungen (Nausea, Emesis, Mucositis) (Aktories und Unger, 2005; Keilholz; Knoth und Sauer, 2006).

Platinverbindungen

Die Platinderivate wurden in den 70er- und 80er-Jahren entwickelt. Sie sind zellphasenunspezifisch und führen ähnlich wie Alkylanzien zu Vernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges, zwischen zwei benachbarten DNA-Strängen oder zwischen DNA und Proteinen. Dieses erfolgt durch die hohe Nucleophilie der Platin-Komplexe (Pirker, 2004). Wichtige Vertreter sind Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin, die vor allem bei Tumoren des Urogenitaltrakts angewendet werden. Dosislimitierend ist die Nephrotoxizität (Aktories und Unger, 2005).

Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea)

Dieses Zytostatikum hemmt die Ribonukleotid-Reduktase, die Ribonukleosiddiphosphate in die Desoxyribonukleotide umwandelt. Dadurch wird die DNA-Synthese blockiert. Hydroxyharnstoff ist für die S-Phase des Zellzyklus spezifisch und führt zur Akkumulation von Zellen. Verwendet wird Hydroxyharnstoff oral bei myeloproliferativen Erkrankungen. Nebenwirkungen sind eine rasch reversible Knochenmarkdepression, seltener Erytheme, Alopezie und Stomatitis (Aktories und Unger, 2005).

Antimetaboliten

Als Antimetabolite werden Zytostatika zusammengefasst, welche als Homologa von Stoffwechselbausteinen die Synthese von DNA und RNA hemmen. Sie wirken bevorzugt in der G1- und S-Phase des Zellzyklus und sind somit zellphasenspezifisch. Sie wirken weniger mutagen als Alkylanzien und auch die myelosuppressive Wirkung ist geringer (Pirker, 2004). Antimetaboliten lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Zunächst die Folsäure-Antagonisten, zu denen das Methotrexat gehört. Die zweite Gruppe bilden die Purin- und Purinnucleosidanaloga mit den Vertretern Fludarabin, Cladribin, Pentostatin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin. Die dritte Gruppe besteht aus den Pyrimidin- und Pyrimidinnucleosidanaloga (5-Fluorouracil, Cytarabin, Gemcitabin) (Aktories und Unger, 2005).

Fludarabin

Dieser Purinantagonist (2-Fluoro-Ara-AMP) gehört zu den wichtigsten und am besten untersuchten Zytostatika bei der Therapie der CLL. Nach intravenöser Gabe und Dephosphorylierung kommt es zur zellulären Aufnahme und dort zur Aktivierung über die Desoxycytidinkina-

se zum Di- und Triphosphat. Anschließend folgt eine Inkorporation als falsche Base in DNA und RNA. Wodurch letztendlich die Apoptose induziert wird. Es besteht eine Resistenz gegen den Abbau durch die Adenosindesaminase. Eingesetzt wird Fludarabin neben der Behandlung der CLL auch bei weiteren niedrigmalignen Lymphomen. Hauptnebenwirkung ist die Myelosuppression mit Neutropenie und Lymphopenie, die vor allem die T-Helferzellen betrifft. Dadurch kommt es häufig zu Infektionen (Keilholz, Knoth et al., 2006).

Cladribin

2-Chloro-2'-desoxyadenosin (2-CdA) unterscheidet sich von dem physiologischen Desoxyadenosin durch ein Chloratom in Stellung 2. 2-CdA wird intrazellulär zu Chlordesoxyadenosintriphosphat aufgebaut, das die DNA-Synthese hemmt. Zudem wird die Reparatur der DNA blockiert.

Cladribin ist besonders gut wirksam bei der Haarzellen-Leukämie und bei niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Hauptnebenwirkung ist die Neutropenie, in deren Folge Infektionen auftreten können. Bei wiederholter Gabe kommt es zu einer kumulativen Myelotoxizität mit verlängerter Thrombozytopenie (Keilholz, Knoth et al., 2006).

Mikrotubuli-Inhibitoren

Zu den Mikrotubuli-Inhibitoren gehören die Vinca-Alkaloide und die Taxane. Die Alkaloide sind Mitosehemmstoffe, welche spezifisch an das Cytoskelettprotein Tubulin binden. Dadurch wird die Polymerisation zu Mikrotubuli und damit die Ausbildung des Spindelapparates blockiert. Die Zelle verbleibt in der Metaphase der Mitose, was am Ende zum Zelltod führt (Aktories und Unger, 2005). Da die Mikrotubuli auch für den Neurotransmittertransport in den Neuronen wichtig sind und die Vinca-Alkaloide auch an diese Mikrotubuli binden, kommt es somit zu neurotoxischen Wirkungen mit verminderten Sehnenreflexen und Parästhesien. Wichtige Vertreter sind Vincristin, Vinblastin, Vindesin und Vinorelbin. Indikationsspektrum und Nebenwirkungen sind bei den verschiedenen Substanzen sehr unterschiedlich (Keilholz, Knoth et al., 2006).

Taxane, hemmen die Depolymerisation der Mikrotubuli und führen zu einer Stabilisierung der Mikrotubuli. Dadurch wird die Mitose gehemmt und die Zellen werden in der M-Phase arretiert. Paclitaxel und Docetaxel sind die bekanntesten Vertreter dieser Substanzgruppe (Pirker, 2004).

Vincristin

Vincristin (VCR) ist ein Extrakt aus der Immergrünart *Vinca rosea* (*Catharanthus roseus*) (Keilholz, Knoth et al., 2006). Dieser Mitosehemmer wird intravenös verabreicht. Die Anwendungsbreite ist sehr groß, so wird Vincristin bei Leukämien, Lymphomen, Bronchial- und

Mammakarzinomen eingesetzt (Aktories und Unger, 2005). Dosislimitierend ist die Neurotoxizität (Pirker, 2004).

Topoisomerase-Inhibitoren

Diese Gruppe wird in die Topoisomerase-I- und Topoisomerase-II-Inhibitoren unterteilt. Zu den letzteren gehören Etoposid und Teniposid. Sie hemmen das Enzym Topoisomerase-II. Topoisomerasen sind an der Entwindung bestimmter Chromosomenabschnitte beteiligt. Durch Öffnen und anschließendes Wiederverknüpfen von DNA-Strängen schaffen sie die strukturellen Voraussetzungen der Replikation. Etoposid und Teniposid hemmen einerseits die Enzymaktivität, andererseits stabilisieren sie die Bindung von Topoisomerase-II an DNA-Spaltstellen, die nachfolgend nicht verschlossen werden können. Die Wirkungsweise der Topoisomerase-I-Inhibitoren ist ähnlich. Hier wird lediglich nur ein DNA-Strang gespalten und wieder verknüpft. Zu dieser Gruppe gehören Topotecan und Irinotecan (Pirker, 2004).

Etoposid wird insbesondere bei der Therapie von Hodentumoren, Bronchialkarzinomen und Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. Teniposid ist wirksam bei akuten Leukämien und Lymphomen. Irinotecan ist für die Therapie von Kolonkarzinomen und Topotecan für die Therapie von Ovarialkarzinomen zugelassen. Hauptnebenwirkung ist bei allen vier Substanzen die Myelosuppression (Aktories und Unger, 2005).

Antitumorantibiotika

Die Antibiotika mit cytostatischer Wirkung leiten sich von verschiedenen Stämmen des Pilzes der Gattung „*Streptomyces spp.*“ ab. Sie umfassen die Stoffgruppe der Anthrazykline, aber auch der Actinomycine, Bleomycine, Mitomycine und davon abgeleitete synthetische Substanzen.

Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe, die Anthrazykline, wirken durch die Interkalation des planaren Moleküls in die DNA bzw. RNA. Dadurch wird die dreidimensionale Struktur der DNA geändert (Aktories und Unger, 2005). Des Weiteren erzeugen sie DNA-Strangbrüche, hemmen die Topoisomerase II und bilden Radikale. Anthrazykline wirken in allen Phasen des Zellzyklus, sind aber am toxischsten für Zellen in der S- und G₂-Phase. Wichtige Vertreter sind Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin und Idarubicin (Pirker, 2004).

Doxorubicin (Adriamycin)

Doxorubicin wird aus dem Pilz *Streptomyces pencetus var. caesius* gewonnen. Es wird wie alle Anthrazykline venös verabreicht (Aktories und Unger, 2005). Doxorubicin wird bei einer Vielzahl von soliden Tumoren (Mamma-, Bronchialkarzinom und Weichteilsarkome), aber auch bei Leukämien und Lymphomen eingesetzt. Dosislimitierend ist auch hier die Myelosuppression (Pirker, 2004). Eine typische Nebenwirkung der Anthrazykline ist zudem die ho-

he Kardiotoxizität. Deren Ursache wird auf die Radikalbildung der Anthrazykline zurückgeführt. So entstehen entweder akut Herzrhythmusstörungen oder nach dosisabhängiger Kumulation Myokardschäden. Da die Ausscheidung primär über die Galle erfolgt, ist auf eine gute Leberfunktion zu achten (Keilholz, Knoth et al., 2006).

Mitoxantron

Dieses Antibiotikum (Dihydroxyanthracendionderivat, DHAD) mit zytostatischer Wirkung gehört zu den Actinomycinen. Es interkaliert mit der DNA und führt durch Interaktion mit Topoisomerase zu DNA-Strangbrüchen. Die Radikalbildung ist weniger stark ausgeprägt als bei den Anthrazyklinen, deshalb ist diese Substanz weniger kardiotoxisch. Angewendet wird es vor allem bei Mammakarzinomen, Non-Hodgkin-Lymphomen, akuten Leukämien und dem Prostatakarzinom. Neben der Kardiotoxizität ist auch hier die Knochenmarksuppression dosislimitierend (Aktories und Unger, 2005; Keilholz, Knoth et al., 2006).

Hormone

Hormone werden gleichermaßen für die antineoplastische Therapie bei hormonsensitiven Tumoren, wie für die Substitutionstherapie bei Ausfall von Hormonproduktion aufgrund zytostatischer Chemotherapie verwendet. Eingesetzt werden dabei die physiologischen Hormone, Hormonanaloga, Hormonantagonisten und Substanzen, die in die Hormonsynthese eingreifen (Aktories und Unger, 2005).

Glukokortikoide

Glukokortikoide werden aufgrund ihrer lymphoklastischen Wirkung bei der Therapie von lymphatischen Leukämien und Lymphomen angewandt. Prednison ist hier die Standardsubstanz (Aktories und Unger, 2005). Dieses muss in der Leber jedoch erst in das pharmakologisch wirksame Prednisolon umgewandelt werden (Kroker, 1999).

Bis vor einigen Jahren wurde bei der Therapie der CLL häufig das sogenannte Knospeschema verwendet, dies besteht aus einer Kombination von Chlorambucil und Prednison. Da für diese Kombination aber kein therapeutischer Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Chlorambucil nachweisbar ist, wird von dieser Therapiemöglichkeit mittlerweile abgesehen (Han, Ezdinli et al., 1973).

In der Veterinärmedizin gehört das Prednisolon hingegen zur Standardtherapie der CLL (Teske, 2005).

Enzyme

Asparaginase

Asparaginase (L-Asparaginamidohydrolase) wird aus den Bakterien der Spezies *Erwinia chrysanthemi* gewonnen. Es ist ein Enzym, das Asparagin zu Asparaginsäure desamidiert. Im Gegensatz zu den meisten normalen Zellen sind tumorös veränderte lymphatische Zellen auf extrazelluläres Asparagin angewiesen. Die Proteinsynthese kann nicht mehr ablaufen, wodurch die Zelle abstirbt. Allerdings können Tumorzellen auf alternative Stoffwechselwege umschalten. Asparaginase wird vor allem bei Lymphomen und Melanomen angewendet. Eine schwere Nebenwirkung ist der mögliche anaphylaktische Schock. Weitere Nebenwirkungen sind Gerinnungsstörungen, Hyperglykämien und Pankreatitis (Aktories und Unger, 2005; Keilholz, Knoth et al., 2006).

2.2.4 Zytostatikaresistenz

Neben der Entstehung von Nebenwirkungen stellt die Resistenzbildung bei Chemotherapeutika ein erhebliches Problem bei der Therapie von Neoplasien dar.

Die Zytostatikaresistenz der Tumorzellen kann *a priori* vorhanden sein (intrinsische Resistenz) oder im Laufe der Therapie erworben werden (extrinsische Resistenz). Die klinische Resistenz kann durch eine zellkinetische, eine pharmakokinetische Resistenz oder eine zelluläre (oder biochemische) Resistenz bedingt sein (Pirker, 2004).

Die **zellkinetische Resistenz** ist durch das Wachstumsverhalten des Tumors bedingt. Proliferierende Zellen sind meist chemosensitiv, während nicht proliferierende Zellen wesentlich unempfindlicher sind.

Die **pharmakokinetische Resistenz** kann unter anderem durch verminderte Resorption bzw. Absorption, reduzierte Tumordurchblutung, ungünstige Verteilung im Körper, rasche Metabolisierung bzw. Inaktivierung und rasche Elimination des Zytostatikums hervorgerufen werden.

Die **zelluläre** oder **biochemische Resistenz** kann durch eine Reihe von Mechanismen, wie die Hemmung der zellulären Aufnahme, verstärkte Inaktivierung, verminderte Aktivierung des Zytostatikums, verstärkte DNA-Reparatur, Veränderung des zellulären Zielsubstrates, Überexpression des Zielproteins und verstärkter Zytostatikatransport aus der Zelle (Multidrug-Resistenz) bedingt sein (Pirker, 2004).

Entscheidend für das schlechte Ansprechen verschiedener Neoplasien auf Zytostatika sind die Resistenzmechanismen der Tumorzellen selbst (zelluläre Resistenz) (Gatti und Zunino,

2005). Die Ursachen für eine Resistenz sind multifaktoriell und derzeit nur zum Teil geklärt. Unterschieden werden hochspezifische Resistenzmechanismen, die Anabolismus und Katabolismus von einzelnen Zytostatika sowie die Umgebung der Enzyminhibition durch Änderung von Bindungskonstanten oder Enzymverfügbarkeit betreffen, von universellen Resistenzmechanismen, die mehrere Substanzklassen betreffen. Zu den bisher am besten erforschten gehören u.a. die Multidrug-Resistenz, das Glutathion-Redoxzyklus-Entgiftungssystem und DNA-Reperaturmechanismen (Efferth und Osieka, 2006).

Aneuploidie wird als eine Ursache der hohen Rate und weiten Breite von Zytostatikaresistenzen angesehen (Li, Hehlman et al., 2005).

Ein Teilaspekt der Multidrug-Resistenz ist auf die Expression des Transporters *P-Glykoprotein* zurückzuführen, das ein Produkt des *Multidrug Resistance* (MDR) Gens ist (Werbing, 2006). Dieses Transmembranprotein bewirkt einen aktiven Efflux der Zytostatika aus der Zelle. Eine Expression des MDR-Gens findet sich in vielen soliden Tumoren und bei Leukämien (Pirker, 2004). Es entsteht eine Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika, wie Antitumorantibiotika, Vinca-Alkaloide und Taxane. Dagegen sind Alkylanzien und die meisten Antimetaboliten nicht betroffen (Aktories und Unger, 2005).

Neben *P-Glykoprotein* gibt es noch weitere Transmembranproteine, wie MRP (*multidrug resistance-associated protein*), BCRP (*breast cancer resistance protein*) und LRP (*lung resistance protein*), die analoge Aufgaben haben (Aktories und Unger, 2005; Swerts, Moerloose et al., 2006).

Ein weiterer Resistenzmechanismus, der auf mehrere Zytostatika wirkt, ist das Glutathion-Entgiftungssystem. Glutathion kann mit dem Zytostatikum konjugieren. Dieses Konjugat ist weniger aktiv und wasserlöslicher und wird so aus der Zelle ausgeschleust. Erhöhte Glutathionspiegel sorgen somit für eine Resistenz gegenüber Alkylanzien (Gatti und Zunino, 2005; Luqmani, 2005).

Bei der DNA-Reparatur ist das Tumorsuppressorprotein p53 von Bedeutung. Dieses Protein sorgt dafür, dass bei geschädigten Zellen die Apoptose induziert wird. In Tumorzellen ist dieses Gen häufig funktionslos. So ist es möglich, dass geschädigte DNA sich weiter replizieren kann und somit eine Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Zytostatika entsteht (Luqmani, 2005).

Diese beschriebenen Resistenzmechanismen machen nur einen kleinen Teil der bisher erforschten und vor allem der wahrscheinlich existierenden Resistenzmechanismen aus. Gemeinsam ist diesen Resistenzmechanismen aber, zumindest zum momentanen Zeitpunkt, ihre geringe klinische Relevanz.

Auch die Resistenzmechanismen bei der chronischen lymphatischen Leukämie sind nur annähernd geklärt. Bei dieser Erkrankung soll neben den oben genannten vor allem eine vermehrte Ausschüttung vom Anti-Apoptose Faktor Bcl-2 und die Inaktivierung des Pro-

Apoptose Faktors Bax eine Rolle spielen (Aleskog, Larsson et al., 2005; Bosanquet, Sturm et al., 2002).

Das Problem einer Zytostatikaresistenz und somit ein Therapieversagen unter einer Chemotherapie tritt auch beim Hund auf. Die Forschung ist diesbezüglich zwar in der Veterinärmedizin noch nicht so weit fortgeschritten, wie in der Humanmedizin, aber eine Multidrug-Resistenz aufgrund des caninen MDR-Gens und somit der Überexpression des *P-Glykoproteins* wurde nachgewiesen (Manhart, Messick et al., 2001).

2.3 *In-vitro* Chemosensibilitätstests

Seit der Anwendung von zytostatischer Chemotherapie bei der Therapie von Tumoren hat sich gezeigt, dass Patienten mit identischer Tumor-Histologie unterschiedlich auf das gleiche Therapieschema ansprechen. Deshalb war es seit den 50er Jahren das Ziel von Onkologen, die Therapie von Tumorpatienten zu individualisieren (Bellamy, 1992).

Die Evaluierung prognostischer Faktoren, aufgrund derer eine sinnvolle Therapiestratifizierung möglich würde, hat sich bisher nur zum Teil als relevant erwiesen (Neurohr, 2003). Aus diesem Grund wurden *in-vitro* Chemosensibilitätstests entwickelt. Mit Hilfe dieser Tests können prätherapeutisch wirksame Zytostatika identifiziert werden, indem eine Sensibilitäts- bzw. Resistenzbestimmung durchgeführt wird. Retrospektive und prospektive Studien (Weisenthal et al., 1983; Bird et al., 1986; Kaspers et al., 1991; Bellamy, 1992; Bosanquet und Bell, 1996; Staib et al., 2005) bei Leukämien und soliden Tumoren haben gezeigt, dass durch diese *in-vitro* Assays die Sensibilität bzw. Resistenz genau bestimmt werden kann. Somit kann mit dem Wissen der Sensitivität eines Tumors gegenüber einem bestimmten Zytostatikum die Therapieplanung entscheidend beeinflusst werden. Des Weiteren kann eine ineffektive Therapie vermieden werden und dem Patienten somit unnötige Belastungen und Kosten erspart bleiben. Zudem kann solchen Patienten eher eine alternative Therapie angeboten werden (Blumenthal, 2005).

Grundlage aller *in-vitro* Chemosensibilitätstests ist zunächst die Entnahme malignen Zellmaterials vom Patienten. Dieses wird aufgereinigt und anschließend unter nativen Bedingungen *in-vitro* mit verschiedenen Zytostatika inkubiert. Als Überlebenskontrolle werden mehrere Ansätze ohne Anwesenheit von Zytostatika kultiviert. Die Betrachtung der diese Kultivierung überlebenden Zellen geschieht jedoch auf sehr unterschiedliche Weise (Schinköthe, 2001).

Zuerst wurde in den siebziger Jahren der Clonogenic-Assay (human tumor colony-forming assay) eingeführt (Hamburger und Salmon, 1977). Dieser Langzeittest geht von der Annahme aus, dass nur die überlebenden Zellen, die nach der Zytostatikainkubation noch in der Lage sind zu proliferieren, für einen Therapieerfolg von Bedeutung sind. Daher werden bei diesem Test die Zellen in Petrischalen auf weichem Agar ausplattiert und über einen Zeitraum von zwei bis vier Wochen kultiviert. Die anschließende Zahl der Kolonien ist ein Maß für die Wirksamkeit des jeweiligen Zytostatikums (Schinköthe, 2001). Dieser Test galt aufgrund der in mehreren Studien belegten guten Korrelation zwischen *in-vitro* Chemosensibilität und klinischem Therapieansprechen in den achtziger Jahren als „Goldstandard“ unter den *in-vitro* Tests (Weisenthal und Lippman, 1985). Nachteilig ist aber die hohe Störanfälligkeit des Testes und dadurch der geringe Anteil an auswertbaren Tests. Zudem ist die Testdauer zu lang.

Aus diesem Grund wurden in den 80er Jahren direkte und indirekte Kurzzeit-Chemosensibilitätstests entwickelt. Bei den direkten Testsystemen setzte sich vor allem der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay durch (Weisenthal, 1983). Im Gegensatz zum Clonogenic-Assay betrachtet dieser Test das Zellsterben der gesamten Tumorzellpopulation (Neurohr, 2003). Die indirekten Testsysteme verwenden einen Indikator, welcher von den lebenden Zellen metabolisiert wird. Diese Metabolisierung dient als Maßzahl für die Vitalität der Überlebenden Zellen. Hier setzte sich vor allem der MTT (Methyl-Thiazol-Tetrazolium)-Assay durch, bei dem die überlebenden Zellen das verwendete MTT-Salz in ihren Mitochondrien zu Formazan metabolisieren, welches colorimetrisch gemessen wird (Cole, 1986). Nachteil dieses Tests ist die fehlende Differenzierungsfähigkeit zwischen malignen und regulären Zellen der Hämatopoese, sowie die Fehlerquote bei Proben mit geringem Blastenanteil (Neurohr, 2003).

2.3.1 DiSC-Assay

Der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay ist ein mikroskopisch auswertbarer Farbstoffexklusions-Test. Er beruht auf dem Prinzip, dass tote Zellen bestimmte Farbstoffe, in diesem Fall FastGreen-Nigrosin, nicht mehr aus dem Intrazellularraum pumpen können und entsprechend gegenüber lebenden Zellen selektiv angefärbt werden. Bei der mikroskopischen Auswertung wird dann der prozentuale Anteil der überlebenden Zellen bezogen auf die Kontrollen ermittelt. Dieses Testsystem wird hauptsächlich bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems angewendet. 1983 wurde der DiSC-Assay von der Arbeitsgruppe Weisenthal etabliert und durch die Arbeitsgruppen Bird und Bosanquet weiterentwickelt (Bird, Bosanquet et al., 1986; Bosanquet, 1991; Weisenthal, Marsden et al., 1983).

Aufgrund der mikroskopischen Auswertung im DiSC-Assay können die Tumorzellen durch ihre spezielle Morphologie von den normalen Zellen der Hämatopoese unterschieden werden. Diese Selektivität zur Bestimmung der Chemosensitivität ist einzigartig und erklärt die hohe Vorhersagbarkeit der klinischen Zytostatikawirkung (Neurohr, 2003). So wurde in einer zusammenfassenden Studie von insgesamt 510 Korrelationen eine durchschnittliche Vorhersagegenauigkeit von 83 % angegeben (Bosanquet, 1994). Weitere Vorteile des DiSC-Assays sind die relativ wenigen Tumorzellen, welche zur Auswertung erforderlich sind (im Vergleich zu colorimetrischen Testverfahren), sowie die kurze Testdauer von vier bis sieben Tagen.

Nachteile des DiSC-Assay sind der hohe Arbeitsaufwand, welcher vor allem durch die aufwendige mikroskopische Auswertung entsteht. Ebenfalls ist hierbei die mögliche Variabilität der Auswertung durch unterschiedliche Untersucher zu bedenken.

2.3.2 Auswertungsverfahren

Vor allem in der Entwicklung neuer Auswertungsverfahren des DiSC–Assays wurde in den vergangenen Jahren viel geforscht, um die Vorhersagegenauigkeit des Testverfahrens erhöhen zu können. Allen diesen Auswertungsverfahren liegt die Notwendigkeit zu Grunde, einen Vergleich mit dem klinischen Ergebnis zu ermöglichen und eine Unterteilung in *in-vitro* Sensibilität und *in-vitro* Resistenz vorzunehmen.

Zu Beginn der Chemosensitivitätstestung wurde überwiegend der **TCS 30%** (Tumor Cell Survival) angewendet. Bei dieser Auswertungsmethode wird eine *in-vitro* Sensibilität vorhergesagt, wenn nach der Inkubation mit einer zuvor festgelegten Zytostatikakonzentration, welche dem *in-vivo* Zytostatika-Plasmaspiegel entsprechen soll, höchstens 30 % der Tumorzellen noch am Leben sind. Ansonsten wird eine Resistenz angenommen (Weisenthal, Marsden et al., 1983). Unter Anwendung dieser Auswertungsmethode konnte die Arbeitsgruppe Bird eine 84%ige positive Korrelation zwischen *in-vitro* Vorhersage und klinischem Ansprechen bei der Untersuchung von 44 Patienten mit lymphatischen Neoplasien zeigen (Bird, Bosanquet et al., 1988).

Etwas später wurden für die Auswertung des DiSC–Assays der **LC₅₀** und **LC₉₀** (lethal concentration) eingeführt. Hierbei wird die *in-vitro* Sensibilität definiert anhand der Zytostatikakonzentration, die notwendig ist, um 50 % (LC₅₀) bzw. 90 % (LC₉₀) der Tumorzellen zu töten (Bosanquet und Bell, 1996). Bei einer Korrelation der *in-vitro* Vorhersage unter Anwendung des LC₉₀ und dem klinischem Ansprechen konnte die Arbeitsgruppe Bosanquet eine 94%ige Übereinstimmung zeigen. In dieser Studie wurden insgesamt 34 Patienten, welche an chronischer lymphatischer Leukämie litten, verglichen (Bosanquet, Copplestone et al., 1999).

Alle bisher beschriebenen Methoden haben die Tatsache gemeinsam, dass zur Beurteilung über das *in-vitro* Ansprechen nur ein Punkt der Dosis-Wirkungsbeziehung herangezogen wird. Entweder eine Konzentration bei den LC₅₀ / LC₉₀–Methoden oder eine Zellzahl bei der TCS 30 %-Methode. Der restliche Verlauf der Dosis-Wirkungskurve bleibt jedoch unbeachtet. Zudem ist ein Vergleich der Zytostatika untereinander nicht möglich (Schinköthe, 2001).

Um diesen Problemen gerecht zu werden, wurde eine neue Auswertungsmethode entwickelt. Sie berücksichtigt die gesamte Dosis-Wirkungsbeziehung einer Substanz durch Anwendung der Fläche unterhalb der Dosis-Wirkungskurve (area under the curve, AUC). Als Endgröße wird der **Chemosensibilitätsindex C_i** ermittelt, dem ein Definitionsbereich von 0 bis 1 zugeordnet ist. Der C_i ist ein Index für die Wirkwahrscheinlichkeit. Werte, welche größer als 0,5 sind, sagen eine *in-vitro* Sensibilität vorher und Werte unter 0,5 eine *in-vitro* Resistenz (Schinköthe, 2001; Staib, Lathan et al., 1999). Für die akute myeloische Leukämie (AML) konnte die Arbeitsgruppe Staib mit Hilfe dieses Auswertungsverfahrens eine korrekte Vorhersage bezüglich des Ansprechens auf die Chemotherapie von 98,2 % zeigen (Staib,

Staltmeier et al., 2005). Für die chronische lymphatische Leukämie wurde der Chemosensibilitätsindex C_i bisher noch nicht angewendet.

2.3.3 *In-vivo* / *in-vitro* Korrelation

Bei einer *in-vitro* Testung stellt sich natürlich immer die Frage der Vergleichbarkeit mit der Situation *in-vivo*. Wichtige Faktoren sind hier die klinische Verfassung des Patienten, die Pharmakokinetik, die Verwendung von Prodrugs und die Anwendung einer Polychemotherapie.

In zwei Studien wurde die intrazelluläre Konzentration von Zytostatika in lymphatischen Zellen *in-vivo* und *in-vitro* verglichen. Es zeigte sich kein erheblicher Unterschied (Sundman-Engberg, Tidefelt et al., 1993; Sundman-Engberg, Tidefelt et al., 1990).

Eine hohe Übereinstimmung zwischen *in-vitro* Testung und dem klinischen Ansprechen ist zudem ein deutlicher Beweis der Übertragbarkeit.

Um auf das Problem der eventuellen Schwankungen der Plasmakonzentration eines Zytostatikums entgegenzuwirken, werden bei der Testung neben der vom Hersteller der Therapeutika angegebenen Plasmakonzentration insgesamt vier weitere Konzentrationen getestet. Zwei niedrigere und zwei höhere Konzentrationen.

Bei einer Polychemotherapie kann nicht unterschieden werden, welches Zytostatikum gewirkt hat. Zudem sind Wechselwirkungen der Therapeutika untereinander zu beachten. Eine *in-vitro* Testung in allen denkbaren Kombinationen wäre zu arbeitsintensiv. Aus diesem Grund wird diese Problemstellung durch das Auswertverfahren gelöst, indem zur Definition einer *in-vitro* Resistenz nur Patienten verwendet werden, welche auf keine Substanz angesprochen haben (Schinköthe, 2001).

Die Anwendung von Prodrugs stellt sicherlich ein Problem dar. So kann zum Beispiel das Alkylanz Cyclophosphamid nicht *in-vitro* getestet werden, da die Wirksubstanz erst durch eine Lebermetabolisierung entsteht.

2.4 Chronische lymphatische Leukämie beim Mensch

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist eine neoplastische lymphoproliferative Systemerkrankung. Sie ist gekennzeichnet durch die klonale Expansion und Akkumulation kleiner, morphologisch reif wirkender, jedoch immunologisch inkompetenter Lymphozyten im Knochenmark, peripheren Blut, in Lymphknoten, Leber und Milz sowie seltener in anderen Organen (Knauf and Thiel, 1999). In über 95 % der Fälle liegt eine klonale Expansion neoplastischer B-Lymphozyten vor, in nur 5 % von T-Lymphozyten. Die CLL wird nach WHO (Weltgesundheitsorganisation)-Vorgaben als niedrigmalignes Non-Hodgkin-Lymphom klassifiziert und je nach Phänotyp in die Reihe der peripheren B- oder T-Zell-Neoplasien eingeordnet (Tabelle 2.2; Staib und Reiser, 2004).

Tabelle 2.2: WHO-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome

Die häufigsten Lymphome sind durch Fettdruck hervorgehoben

Quelle: Modifiziert nach Kompetenznetz Maligne Lymphome (2005)

B-ZELL LYMPHOME	T-Zell LYMPHOME
ZELL-VORLÄUFER-NEOPLASIEN	
B-Zell-Vorläufer lymphatisches Lymphom	T-Zell-Vorläufer lymphatisches Lymphom
REIFE (PERIPHERE) NEOPLASIEN	
B-Zell chronische lymphatische Leukämie Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom Lymphoplasmazytoides Lymphom Mantelzell-Lymphom Folikuläres Lymphom Follikelzentruns-Lymphom Extranodales Marginalzonen Lymphom (MALT) Nodales Marginalzonen Lymphom Marginalzonen-Lymphom der Milz Haarzell-Leukämie Plasmozytom/Plasmazell-Myelom Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom Primäres mediastinales großzelliges B-Zell Lymphom Burkitt-Lymphom Hochmalignes B-Zell Lymphom, Burkitt-ähnlich	T-Zell chronische lymphatische Leukämie, prolymphozytäre Leukämie Leukämie großer granulärer Lymphozyten Agressive NK-Zell Leukämie Mycosis fungoides / Sézary Syndrom Peripheres T-Zell Lymphom Angioimmunoblastisches Lymphom Angiozentrisches Lymphom Intestinales T-Zell Lymphom Adultes T-Zell Lymphom / Leukämie Anaplastisches großzelliges Lymphom

2.4.1 Epidemiologie

Die CLL ist mit einem Anteil von 30 % die häufigste Leukämie der westlichen Welt. Sie ist eine Erkrankung des Alters und tritt sehr selten vor dem 40. Lebensjahr auf. Pro Jahr kommt es zu drei Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner (Staib und Reiser, 2004).

Bei Diagnosestellung sind die Patienten im Median 65 Jahre alt. Zu diesem Zeitpunkt sind ungefähr ein Drittel der Erkrankten jünger als 65 Jahre und nur etwa 10 % sind jünger als 50 Jahre (Korte und Cogliatti, 2004). Männer erkranken doppelt so häufig wie Frauen (Staib und Reiser, 2004). Bei Asiaten tritt die Erkrankung deutlich seltener auf als bei anderen Bevölkerungsgruppen (SEER, 2005).

2.4.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der CLL ist ungeklärt. Der Einfluss von Umweltfaktoren, wie ionisierender Strahlung, chemischer oder anderer Noxen wird diskutiert, ist aber nicht gesichert (Hallek, Bergmann et al., 2002). Genetische Faktoren spielen eine Rolle, so haben Kinder von CLL-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko an einer CLL oder einer anderen lymphatischen Neoplasie zu erkranken (Hallek, Bergmann et al., 2002; Goldin und Landgren, 2005). Nachgewiesen ist eine altersassoziierte Zunahme der Inzidenz, weshalb alterungsbedingte Prozesse eine Rolle spielen sollen. So steigt zum Beispiel die Rate von bei Gesunden nachweisbaren chromosomalen Translokation des bcl-2 Gens (t 14; 18) mit dem Alter der Testpersonen an, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit sekundärer, leukämieauslösender genetischer Veränderungen erhöht (Trümper, Möller et al., 2001).

In über 80 % der CLL-Patienten werden mit Hilfe moderner Untersuchungstechniken wie der FISH-Methode (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) zytogenetische Anomalien gefunden (Staib und Reiser, 2004). Diese sind teilweise mit einem signifikant schlechteren Überleben verbunden. Inwieweit diese Anomalien ursächlich für die Erkrankung sind oder erst im Laufe der Erkrankung entstehen, muss noch geklärt werden. Fest steht aber, dass der Ursprung der Erkrankung bei einem Teil der Patienten von einer Memory-B-Zelle (mutiertes Ig V_H-Gen) und bei einem anderem Teil der Patienten von einer naiven B-Zelle (unmutiertes Ig V_H-Gen) ausgeht (Krober, Seiler et al., 2002). Jüngere Untersuchungen vermuten, dass eine antigene Stimulation gemeinsam mit den Einflüssen von Zytokinen, Chemokinen und Blutzellen die fördernde Faktoren für eine Proliferation von CLL-Zellen sind und ihnen helfen, die Apoptose zu vermeiden (Chiorazzi, Kanti et al., 2005).

Eine Vermehrung der atypischen immuninkompetenten B-Lymphozyten entsteht also durch eine erheblich verlängerte Überlebenszeit dieser Zellen, welche wahrscheinlich durch die Hemmung der Apoptose verursacht wird. Zudem soll die Zellvermehrung, zumindest bei ei-

nem Teil der Patienten und, im Gegensatz zu früherer Annahme, auch durch vermehrte Proliferation entstehen (Messmer, Messmer et.al., 2005). Durch die Akkumulation und Infiltration der Lymphozyten in Blut, Knochenmark, Lymphknoten, Milz und Leber entstehen die typischen Symptome der Erkrankung (Staib und Reiser, 2004).

2.4.3 Klinische Symptome

Da die chronische lymphatische Leukämie eine langsam fortschreitende Erkrankung ist, sind ein Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose symptomarm oder sogar symptomfrei. In 25% der Fälle wird die CLL zufällig entdeckt (Staib und Reiser, 2004). Erste Anzeichen der Erkrankung sind meist (zervikale) Lymphknotenschwellungen und unspezifische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, blasse Haut und Leistungsminderung sowie häufige Infekte. Später können eine Gewichtsabnahme und eine vermehrte Schweißneigung auftreten. Der weitere Krankheitsverlauf ist durch die unterschiedlich rasch zunehmende Tumormasse und eine immunologische und hämatologische Insuffizienz gekennzeichnet.

Lymphknotenschwellungen zeigen 70-80 % der Patienten (Hansen, 1973), wobei die Ausdehnung mit der Krankheitsdauer korreliert. Die Lymphknoten sind kirsch- bis apfelgroß, mittelhart, verschieblich und bei der Palpation schmerzlos. Am häufigsten sind die zervikalen, dann die axillären und inguinalen Lymphknoten befallen. Zu 54-75 % weisen die Patienten auch eine Splenomegalie (Oduncu und Emmerich, 2005) auf und etwas seltener (45-75 %) auch eine Vergrößerung der Leber, welche auf eine lymphatische Infiltrierung zurückzuführen ist. Weitere unspezifische Symptome können entstehen, je nachdem welche Organe befallen und beeinträchtigt werden. Es sind vorallem die Lunge, der Intestinaltrakt, der Urogenitaltrakt und das Nervensystem betroffen, seltener auch die Haut (Oduncu und Emmerich, 2005).

Im fortschreitenden Krankheitsverlauf treten Infekte (Pneumonien, Sepsis) immer mehr in den Vordergrund. Durch die zunehmende hämatopoetische Insuffizienz kommt es zur Anämie und evtl. Thrombozytopenie mit entsprechenden Symptomen wie Dyspnoe oder Blutungen (Korte und Cogliatti, 2004). Jeder zehnte Patient leidet außerdem unter einer autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) oder eventuell einer Autoimmunthrombozytopenie (Staib und Reiser, 2004).

2.4.4 Diagnostik

Heutzutage gehören zur Diagnostik der CLL als obligatorische Maßnahmen neben der Anamnese und körperlichen Untersuchung des Patienten ein Blutbild und die Immunphänotypisierung. Des Weiteren wird häufig zur Abschätzung von Stadium und Prognose eine Knochenmarkpunktion samt Histologie und Zytologie bzw. eine Lymphknotenhistologie durchgeführt.

Zur Diagnosesicherung wird nach den Empfehlungen der „National Cancer Institute-sponsored Working Group“ eine anhaltende Blutlymphozytose von $> 5 \times 10^9/l$ bei gleichzeitigem durchflusszytometrischen Nachweis eines B-CLL spezifischen Immunphänotyps und einer Leichtkettenrestriktion der Oberflächenimmunglobuline gefordert (Schinköthe und Hallek, 2005).

Anamnese und körperliche Untersuchung

Da gerade zu Beginn der Erkrankung der chronischen lymphatischen Leukämie nur selten deutliche Symptome zu sehen sind, ist eine gründliche Anamnese und körperliche Untersuchung des Patienten unumgänglich. Hier ist besonders auf die Krankheitsanzeichen, wie Abgeschlagenheit, Fieber, Nachtschweiß oder Gewichtsverlust zu achten. Außerdem muss eine Adspektion und Palpation aller erreichbaren Lymphknoten sowie der Leber und der Milz durchgeführt werden. Nötigenfalls sollte hier die bildgebende Diagnostik wie Sonographie, Röntgen oder Computertomographie unterstützend angewandt werden (Schinköthe und Hallek, 2005).

Blutbild und Blutausstrich

Vorraussetzung zur klinischen Diagnose der chronische lymphatischen Leukämie ist eine anhaltende absolute Lymphozytose von $> 5 \times 10^9$ Lymphozyten/l im peripheren Blut (Schinköthe und Hallek, 2005).

Bei der Betrachtung des Blutausstrichs sollten die Lymphozyten bei einer CLL folgende Charakteristika aufweisen: überwiegend kleine Lymphozyten mit hellem schmalen Zytoplasmasaum, zentral gelegenen, normal großen und rundlichen Kern sowie sehr dichtem Kernchromatin. Nukleoli sind in der Regel nicht nachweisbar. Die CLL-Lymphozyten haben eine Größe von 1 bis 1½-mal der Größe von Erythrozyten. Häufig zu sehen sind bei einer CLL zudem durch den Ausstrich lädierte Zellen, die so genannten „Gumprecht´schen Kernschatten“. Diese sind aber keinesfalls spezifisch für eine CLL, kommen also auch bei anderen Non-Hodgkin-Lymphomen vor (Schaefer, 2004).

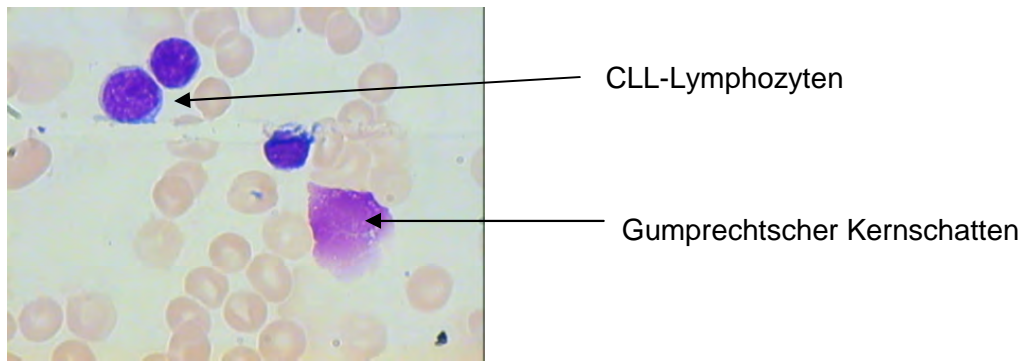


Abb.:2.1: Blutausstrich bei chronischer lymphatischer Leukämie

Quelle: Modifiziert nach Vorlesungsmaterialien von Prof. Hallek (Hallek, 2006)

Die Morphologie der CLL-Zellen kann variieren. Bei einer „typischen“ CLL dürfen bis zu 10 % der Zellen so genannte Prolymphozyten sein. Diese größeren Zellen weisen ein feineres Chromatin mit deutlichem, zentralen Nukleolus und leicht basophilem Zytoplasma auf. Sind mehr als 10 %, aber weniger als 55 % der Zellen Prolymphozyten, so wird von einer CLL/PLL bzw. einer „atypischen“ CLL gesprochen. Bei mehr als 55 % Prolymphozyten im Blutausstrich spricht man von einer Prolymphozytenleukämie (PLL). Auch weitere Kombinationen mit Zellen, welche nicht typische morphologische Eigenschaften aufweisen, können vorkommen, diese nennt man „mixed cell type CLL“ (Schinköthe und Hallek, 2005).

Immunphänotypisierung

Besonders zur Abgrenzung zu anderen Non-Hodgkin-Lymphomen ist die immunphänotypische Untersuchung der Lymphozyten aus dem peripheren Blut bei B-CLL Patienten notwendig geworden. Der Nachweis der Leichtkettenrestriktion (K- oder λ - Typ) beweist die Monoklonalität der Zellen. Das typische Antigenmuster bei der B-CLL zeigt die Co-Expression von CD19, CD20 (schwach), CD5 und CD23 (Schinköthe und Hallek, 2005). Bei der beim Menschen seltenen T-Zell-CLL dominiert der T-Helfer-Phänotyp (CD3+, CD4+,CD8-).

Knochenmarkuntersuchung

Das Knochenmark ist bei der B-CLL immer befallen und mehr oder weniger dicht mit Lymphozyten infiltriert, welche die gleiche Morphologie wie die beschriebenen Lymphozyten im peripheren Blut vorweisen. Zur Diagnosesicherung ist diese Untersuchung jedoch nicht notwendig. Lediglich zur Prognoseabschätzung kann die Histologie dienen, da eine noduläre Infiltration einen deutlich besseren Krankheitsverlauf prognostiziert als eine interstitielle oder diffuse Infiltration. Zum Nachweis einer kompletten Remission ist eine Knochenmarkuntersuchung als Therapiekontrolle vorgegeben (Schinköthe und Hallek, 2005).

Weitere Untersuchungen

Eine histopathologische Untersuchung eines vergrößerten Lymphknotens kann zur Diagnosesicherung und zur Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen wie dem lymphoplasmazytischen Lymphom durchgeführt werden. Das histologische Bild der CLL zeigt eine aufgehobene Lymphknotenarchitektur mit Verlust der Keimzentren und mit Infiltraten kleiner lymphatischer Zellen (Hallek, Bergmann et al., 2002).

Zur Erfassung CLL-assoziiierter Immunphänome sollte ein Coombs-Test durchgeführt und die Serum-Immunglobuline bestimmt werden (Schinköthe und Hallek, 2005).

2.4.5 Prognose

Der klinische Verlauf der chronischen lymphatischen Leukämie ist individuell sehr variabel. Das mediane Überleben schwankt zwischen zwei und 20 Jahren. Zur Prognoseabschätzung wird die klinische Stadieneinteilung nach Binet (Binet, Auquier et al., 1981) angewandt (Tabelle 2.2). Ebenfalls, besonders im amerikanischen Raum wird die Stadieneinteilung nach Rai verwendet (Rai, Sawitsky et al., 1975).

Tabelle 2.3: Stadieneinteilung der chronischen lymphatischen Leukämie nach Binet (1981)

Quelle: (Bergmann and Hallek, 2005)

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hämoglobin > 10,0 g/dl Thrombozytenzahl normal < 3 vergrößerte Lymphknotenregionen	> 10 Jahre
B	Hämoglobin > 10,0 g/dl Thrombozytenzahl normal ≤ 3 vergrößerte Lymphknoten	7 Jahre
C	Hämoglobin ≤ 10 g/dl und/oder Thrombozytenzahl ≤ 100.000 109/l unabhängig von der Zahl der befallenen Lymphknotenregionen	1,5 – 2,5 Jahre

In den letzten zehn Jahren wurden zahlreiche Prognosefaktoren neu entdeckt, so dass die Prognoseabschätzung immer genauer vorhergesagt werden kann. Vor allem in Stadium A zeigen die Patienten einen heterogenen Verlauf (Bergmann und Hallek, 2005). Auf einen ungünstigen Krankheitsverlauf deuten neben dem Alter (>55 Jahre), männlichem Geschlecht und schlechtem Allgemeinzustand (Kalil und Cheson, 1999) folgende Faktoren hin: eine

Lymphknotenverdoppelungszeit von < 12 Monaten (Montserrat, Sanchez-Bisono et al., 1986), eine diffuse Knochenmarkinfiltration, ein erhöhter Serumspiegel für LDH, β_2 -Mikroglobulin und Thymidinkinase (Hallek, Langenmayer et al., 1999), ein unmutiertes Immunglobulin V_H-Gen (Hamblin, Davis et al., 1999), sowie Veränderungen in der molekularen Zytogenetik (Aberrationen Chromosom 11q-, 17p, Trisomie 12) (Döhner, Stilgenbauer et al., 2000).

Zur Zeit werden nicht alle diese Untersuchungen in der Routinediagnostik angewandt, sie werden aber in der Zukunft eine immer größere Rolle spielen.

Eine Heilung der Erkrankung ist bisher nicht möglich. Etwa 50 % der Patienten sterben an Infektionen. Todesursache ist aber, vor allem bei älteren Patienten, häufig eine CLL unabhängige Erkrankung (Staib und Reiser, 2004).

2.4.6 Therapie

Die chronische lymphatische Leukämie ist auch heutzutage, trotz enormer Fortschritte in Diagnostik und Therapieoptionen, nicht heilbar. Die Behandlung hat deshalb eine palliative Grundlage (Staib und Reiser, 2004). Neuere Untersuchungen bei jüngeren Patienten zeigen die Möglichkeit von kurativen Therapieansätzen. Diese Patienten erhielten im Rahmen von multizentrischen Studien Hochdosistherapien und eine Stammzell-Transplantationen (Dreger, Ritgen et al., 2005).

Aufgrund des unterschiedlichen Verlaufs der CLL gibt es drei Therapieoptionen. Häufig wird der Patient nur beobachtet und nicht therapiert. Diese Option wird auch als „watch and wait“ Methode bezeichnet. Die zweite Möglichkeit ist eine Chemotherapie, welche gegebenenfalls mit einer Immuntherapie kombiniert wird. Als dritte Variante gibt es die Hochdosistherapie mit einer folgenden Stammzelltransplantation (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

Welche dieser drei Optionen angewandt wird, hängt vom Alter und der Komorbidität des Patienten, sowie vom klinischen Stadium und von der Krankheitsaktivität (Progression, Vorhandensein ungünstiger Prognosefaktoren) ab (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

Eine Behandlung sollte immer erst durchgeführt werden, wenn eine schwere Anämie, Thrombozytopenie, Hämolyse und/oder symptomatische Lymphadenopathie, Hepatomegalie, Splenomegalie oder B-Symptome (Fieber, Gewichtsverlust, Nachtschweiß) vorliegen (Staib und Reiser, 2004).

Konventionelle Chemotherapie

Die systemische Chemotherapie ist die Therapieform der Wahl. Am häufigsten wird das alkylierende Zytostatikum **Chlorambucil** wegen seiner hohen antilymphozytischen Wirksamkeit bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität für Granulozyten und Thrombozyten verwendet. Die frü-

her häufiger angewandte Kombination mit **Prednison** (Knospe-Schema) sollte heutzutage nur noch bei gleichzeitigem Vorliegen einer autoimmunhämolytischen Anämie oder Autoimmunthrombozytopenie erfolgen (Staib und Reiser, 2004). Mit Chlorambucil werden bei unvorbehandelten Patienten zwischen 30 % und 70 % Remissionen erzielt, die aber nur selten (3 %) komplett sind und meist nur wenige Monate anhalten (Eichhorst, Bergmann et al., 2005). Chlorambucil ist Standardtherapie bei älteren Patienten bzw. Patienten mit hoher Komorbidität.

Bessere Ansprechraten erzielt hingegen das Purinanalogon **Fludarabin**. Bei unvorbehandelten Patienten werden Remissionen von 70-80 % (davon 23-37 % komplette Remissionen) erreicht (Keating, O'Brien et al., 1998). Fludarabin ist momentan die wirksamste Monosubstanz bei der Therapie der CLL und Mittel der Wahl in der Sekundärtherapie (Staib und Reiser, 2004). Allerdings muss Fludarabin im Gegensatz zu Chlorambucil (oral) intravenös verabreicht werden und weist eine höhere Nebenwirkungsrate (Immunsuppression) auf.

Neben Fludarabin wird auch **Cladribin** (2-Chlorodesoxyadenosin,2-cda), ein weiteres Purinanalogon zur Therapie der CLL verwendet. Cladribin ist ähnlich wirksam wie Fludarabin (Hallek, Bergmann et al., 2002). Fludarabin in Kombination mit dem Alkylans **Cyclophosphamid** zeigt signifikant höhere Remissionsraten (94 %) und komplette Remissionen (24 %) als Fludarabin alleine. Aber auch hier sind die myelosuppressiven Wirkungen zu beachten. Diese Kombination sollte besonders bei jüngeren Patienten angewandt werden (Eichhorst, Busch et al., 2006). Relativ neu in der Therapie der CLL ist das Alkylans **Bendamustin**. Erste Studien zeigen eine gute Wirkung. Weitere Untersuchungen sind aber erforderlich (Bergmann, Goebeler et al., 2005).

Bei Therapieversagern oder bei Patienten mit initialer Manifestation als Lymphom kommen folgende Polychemotherapie-Regime zum Einsatz: **CHOP** (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison), **CAP** (Cyclophosphamid, Doxorubicin und Prednison) und **COP** (Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison). Eine fludarabinhaltige Therapie ist aber, sofern keine Resistenz gegenüber diesem Purinanalogon besteht, nicht weniger wirksam (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

In der Tabelle 2.4 sind die vorgeschlagenen Dosierungen der verschiedenen Zytostatika angegeben.

Tabelle 2.4: Dosierungen ausgesuchter Zytostatika bzw. Kombinationen*IKG = Idealkörpergewicht; p.o. = per os; i.v. = intravenös**Quelle: Modifiziert nach (Eichhorst, Bergmann et al., 2005)*

Zytostatikum	Dosierung	Tag der Gabe
Chlorambucil	0,4 -0,8/mg/kg IKG p.o.	Tag 1 und Tag 15
Fludarabin	25 mg/m ² i.v.	Tag 1 bis 5 und Tag 29
Cladribin	0,1 mg/kg i.v.	Tag 1 bis 7 und Tag 29
Bendamustin	70 mg/m ² i.v.	Tag 1 und 2 und Tag 29
Fludarabin + Cyclophosphamid	Fludarabin: 30 mg/m ² i.v. Cyclophosphamid: 250 mg/m ² i.v.	Tag 1 bis 3 und Tag 29 Tag 1-3
CHOP	Cyclophosphamid: 300 mg/m ² i.v. Doxorubicin: 25 mg/m ² i.v. Vincristin: 1 mg/m ² i.v. Prednison: 40 mg/m ² p.o.	Tag 1 bis 5 Tag 1 Tag 1 Tag 1 bis 5 und Tag 22

Immuntherapie

Relativ neu in der Therapie der CLL ist die Verwendung von monoklonalen Antikörpern. Diese binden an Oberflächenantigene von Leukämiezellen und töten über verschiedene Wirkmechanismen (Apoptose, Komplementaktivierung, antikörpervermittelnde zelluläre Zytotoxizität) diese (Hallek, Bergmann et al., 2002). Besonders bei CLL-Rezidenen bzw. bei einer refraktären CLL können die Antikörper Rituximab® (anti-CD20-Antikörper) und Alemtuzumab® (anti-CD52-Antikörper) eingesetzt werden. Alemtuzumab® zeigt gute Ansprechraten bei vorbehandelten wie bei unbehandelten Patienten mit CLL. Rituximab® wird meistens in Kombination mit Fludarabin eingesetzt. Solche Kombinationen sind gegenwärtig Gegenstand klinischer Studien. Nebenwirkungen sind vor allem Unverträglichkeitsreaktionen und teilweise schwer verlaufende Infektionen (Korte und Cogliatti, 2004).

Hochdosistherapie und Stammzell-Transplantation

Für junge Patienten gibt es die Möglichkeit der myeloablativen Hochdosischemotherapie mit anschließender allogener oder autologer Stammzelltransplantation. Eine allogene Knochenmarktransplantation kann durchaus kurativ sein, ist aber mit einer erheblichen therapieasso-

ziierten Mortalität (39-46 %) behaftet. Die autologe Stammzell-Transplantation ist deutlich weniger toxisch (5-10 %), aber dafür ist eine entsprechend hohe Rezidivrate (40-50 %) zu verzeichnen. Beide Verfahren sollten nur in ausgesuchten Einzelfällen durchgeführt werden und weitere Studien sind notwendig (Eichhorst, Bergmann et al., 2005; Korte und Cogliatti, 2004)

Supportive Therapie

Infektionen müssen konsequent antibiotisch therapiert werden. Bei schwerem Antikörpermangel können intravenöse Gammaglobulingaben indiziert sein (Staib und Reiser, 2004). CLL-assoziierte Autoimmunerkrankungen sollten mit Glukokortikoiden therapiert werden (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

2.5 Chronische lymphatische Leukämie beim Hund

Wie beim Menschen beschreibt die chronische lymphatische Leukämie beim Hund auch ein Krankheitsbild, welches durch eine persistierende neoplastische klonale Proliferation von kleinen, reif-wirkenden, aber funktionell defekten Lymphozyten (Workman und Vernau, 2003) vor allem im peripheren Blut und Knochenmark charakterisiert wird. Die lymphozytäre Proliferation schreitet zwar langsam, aber kontinuierlich fort (Mischke, Hungerbühler et al., 2003). Eine Klassifikation der lymphoproliferativen Erkrankungen beim Hund wurde bisher noch nicht beschrieben, weshalb häufig auf die humanmedizinische Einteilung zurückgegriffen wird. Bei der caninen chronischen lymphatischen Leukämie wird abhängig von der Ausgangszelle der Neoplasie eine B-Zell CLL und eine T-Zell CLL unterschieden (Abb.2.2). Des Weiteren wird differenziert zwischen Lymphozyten, welche in ihrem Zytoplasma azurophile Granula (large granular lymphocytes, LGL-CLL) aufweisen oder nicht (nicht-LGL-CLL). Im Gegensatz zum Menschen sind beim Hund T-Zell-Neoplasien häufiger vertreten als B-Zell-Erkrankungen. Aus diesem Grund wird vermutet, dass die Pathogenese der Erkrankung bei Hunden und Menschen unterschiedlich ist. Die Ätiologie ist auch beim Hund unbekannt (Workman und Vernau, 2003).

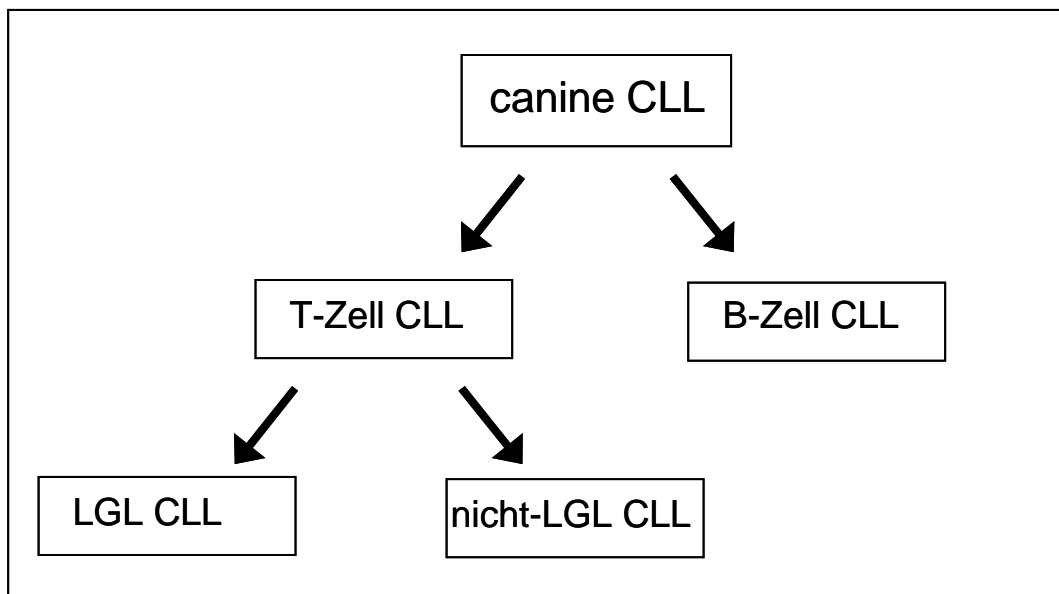


Abb. 2.2: **Formen der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) beim Hund**
LGL = large granular lymphocytes

2.5.1 Epidemiologie

Über die Inzidenz der chronischen lymphatischen Leukämie beim Hund ist wenig bekannt. Es scheint aber, dass sie deutlich weniger häufig auftritt als beim Menschen. Lediglich 3 % aller lymphoproliferativen Erkrankungen wurden einer CLL zugeschrieben (Jain, 1993).

Entsprechend den Verhältnissen beim Menschen tritt die Erkrankung beim Hund im mittleren und fortgeschrittenen Alter auf. Das mediane Alter der Patienten beträgt 10,5 Jahre (Teske, 2005). Eine Geschlechtsprädisposition wie beim Menschen gibt es beim Hund nicht. Das Geschlechterverhältnis ist bei der B-Zell CLL und der nicht-LGL T-Zell-CLL ausgeglichen. Bei den caninen Patienten mit einer LGL T-Zell CLL sind die weiblichen Patienten zahlenmäßig den männlichen überlegen (1,7 : 1 = weiblich : männlich) (Vernau und Moore, 1999). Eine Rasseprädisposition wurde bisher nicht beschrieben (Teske, 2005).

2.5.2 Klinische Symptome

Bei der chronischen lymphatischen Leukämie entwickeln sich die Symptome nur langsam, weshalb sie bei der Diagnosestellung bereits viele Monate bis Jahre bestehen können. Im Vergleich zu akuten Leukämien sind die klinischen Symptome auch weniger stark ausgeprägt. Nicht selten wird die chronische lymphatische Leukämie auch beim Hund als Zufallsbefund festgestellt. Die klinischen Symptome können abhängig von den immunologischen und hämatologischen Veränderungen sehr variieren.

Zuerst zeigen die Tiere unspezifische Allgemeinsymptome wie Lethargie, Anorexie, verminderten Appetit, gelegentlich Vomitus und/oder Diarrhöe, Polyurie/Polydipsie, Fieber, Blässe der Schleimhaut, Lahmheiten oder Blutungen (Mischke, Hungerbühler et al., 2003). Hinzu kommt eine geringe bis mittelgradige Lymphadenopathie (77 %), Splenomegalie (73 %) und Hepatomegalie (45 %) (Teske, 2005). Durch die Vergrößerung dieser Organe sowie durch Infiltration weiterer Organe können sehr unspezifische Symptome hinzu treten.

Bei fortschreitender Erkrankung können Infektionen aufgrund der abnehmenden Anzahl intakter Leukozyten in Form von Bronchopneumonien, Infektionen des Urogenitaltraktes, Pyodermie oder Septikämie entstehen. Diese Infektionen stellen eine Hauptursache für Todesfälle bzw. Euthanasien dar (Mischke, Hungerbühler et al., 2003).

2.5.3 Diagnostik

Wichtig bei der Diagnostik der chronischen lymphatischen Leukämie sind neben Anamnese und klinischer Untersuchung (inkl. Röntgen) vor allem das Blutbild und eine Knochenmarkuntersuchung. Essentiell für die Diagnose ist das Vorhandensein einer persistierenden (> 3 Monate) absoluten Lymphozytose ($> 6.000/\mu\text{l}$; Referenzwert: $1.000-4.000/\mu\text{l}$). Dadurch liegt fast immer auch eine Leukozytose vor. Nicht selten liegt bei Diagnosestellung die Leukozytenzahl bei über $100.000/\mu\text{l}$ und der Lymphozytenanteil über 90 %, so dass die Diagnose sichergestellt werden kann. Die Extremwerte der Lymphozytenzahlen liegen zwischen $6.000/\mu\text{l}$ und über $100.000/\mu\text{l}$ (Mischke, Hungerbühler et al., 2003). Im Blutausstrich sind kleine, reifkernige Lymphozyten mit einem Durchmesser von $7-9 \mu\text{m}$ zu sehen. Das Chromatin ist kondensiert. Wie beim Menschen befindet sich beim Hund im Blutausstrich auch ein hoher Anteil an zerstörten lymphatischen Zellen, die Gumprecht'schen Kernschatten (Workman und Vernau, 2003).

Neben den Veränderungen des weißen Blutbildes findet man häufig bei der CLL eine milde nichtregenerative Anämie (50 %) und eine geringgradige Thrombozytopenie (27%) (Workman und Vernau, 2003).

Als Diagnoseergänzung dient eine Knochenmarkuntersuchung, welche zudem wertvoll ist für die Beurteilung des Stadiums der Erkrankung.

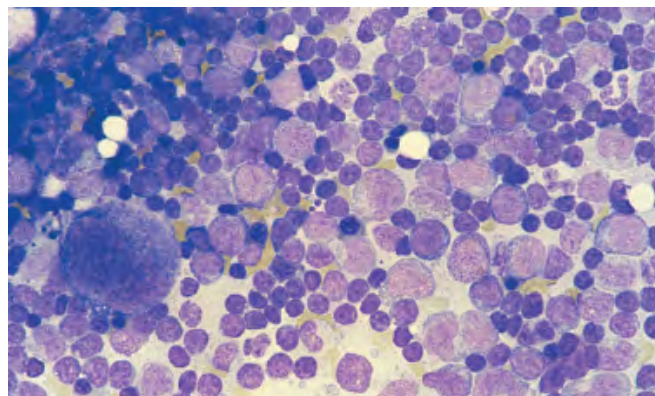


Abb. 2.3: Knochenmarkaspirat eines Hundes mit chronischer lymphatischer Leukämie
über 50% Infiltration mit reifkernigen Lymphozyten
Quelle: (Mischke, Hungerbühler et al., 2003)

Hunde mit einer B-Zell CLL weisen einen Anteil von mehr als 30 % kleinen, reifen Lymphozyten im Knochenmark auf (Mischke, Hungerbühler et al., 2003). Die canine B-CLL stellt eine primäre Knochenmarkserkrankung dar. Hingegen gegensätzlich ist es bei der LGL T-Zell CLL, bei der es primär zu einer Infiltration der Milz kommt, und erst im späterem Verlauf der Erkrankung zu einer stärkeren Infiltration des Knochenmarks (Workman und Vernau, 2003).

Wie beim Menschen wird auch beim Hund in der Diagnostik die Immunphänotypisierung und die Durchflusszytometrie angewendet. Allerdings dient besonders die letztere Methode bisher nur zu wissenschaftlichen Zwecken. Aufgrund der erheblichen prognostischen Bedeutung beim malignen Lymphom wird auch die Immunphänotypisierung caniner Lymphozyten von mehreren Laboratorien angeboten (Mischke, Hungerbühler et al., 2003). Bei der T-Zell CLL dominiert eine Koexpression von CD3+ und CD8+ und bei der B-Zell CLL die Expression von CD21 und CD79a (Workman und Vernau, 2003).

Die Serumproteinelektrophorese, durch die Proteine, welche sich im Blutplasma befinden voneinander getrennt und sichtbar gemacht werden (Roscher, 2000), stellt eine sinnvolle Ergänzung der weiterführenden Diagnostik dar. Zwar haben Hunde im Gegensatz zum Menschen nur selten eine Hypoglobulinämie, aber es zeigt sich oft eine monoklonale Gammapathie. Diese ist meistens vom IgM-Typ und kann zu einer erhöhten Serumviskosität führen (Mischke, Hungerbühler et al., 2003).

2.5.4 Prognose

Der Krankheitsverlauf der chronischen lymphatischen Leukämie beim Hund ist ähnlich dem beim Menschen nicht homogen. Überlebenszeiten schwanken zwischen ein bis drei Jahren. Eine Stadieneinteilung zur Prognoseeinschätzung gibt es für den Hund leider noch nicht, aber auch hier kann gesagt werden, je weiter fortgeschritten die Erkrankung ist, umso schlechter ist die Prognose. Mit Hilfe der Immunphänotypisierung konnte gezeigt werden, dass die T-Zell CLL vom LGL-Typ, welche beim Hund die häufigste Form zu sein scheint, vorwiegend eine chronische, indolente Form sein soll. Ein schlechtes Ansprechen auf eine Chemotherapie deutet hingegen auf eine schlechte Prognose hin (Mischke, Hungerbühler et al., 2003; Workman und Vernau, 2003).

2.5.5 Therapie

Aufgrund des häufigen indolenten Verlaufs der chronischen lymphatischen Leukämie ist eine Therapie selten notwendig. Zudem steht bei der Behandlung von Hunden im Gegensatz zum Menschen eine Verbesserung der Lebensqualität vor einer Lebensverlängerung. Des Weiteren müssen die Durchführbarkeit und Kosten einer eventuellen Therapie beachtet werden. Eine Heilung durch eine Therapie ist nicht möglich, sondern nur eine Kontrolle der Erkrankung und somit ein Leben mit der Neoplasie. Aus diesem Grund sollten bei einem indolenten Verlauf der Erkrankung nur regelmäßige Blutkontrollen durchgeführt werden und nur beim

Auftreten von Symptomen eine antineoplastische Chemotherapie in Betracht gezogen werden. Therapiegründe sind eine sehr hohe Lymphozytenzahl, eine deutliche Organbeteiligung (Knochenmark, Milz, Leber, Lymphknoten), Thrombozytopenie, Anämie, Hyperviskosität des Serums und deutliche klinische Symptome. (Mischke, Hungerbühler et al., 2003)

Zur Chemotherapie beim Hund wird wie beim Menschen primär das Alkylans **Chlorambucil** angewendet. Vorteilhaft sind die einfache orale Verabreichung und die verhältnismäßig wenigen Nebenwirkungen. Häufig wird Chlorambucil mit **Prednisolon** kombiniert. Um eine rasche Remission zu erreichen, kann zusätzlich **Vincristin** hinzugenommen werden. Bei dieser Dreierkombination ergaben sich Langzeitremissionen bei 70 % der Hunde und eine mediane Überlebenszeit von 348 Tagen. 30 % der Tiere lebten länger als zwei Jahre (Leifer und Matus, 1986). Wahlweise kann anstatt von Chlorambucil **Cyclophosphamid** (200-250 mg/m² Körperoberfläche i.v. alle 7 Tage oder 50 mg/m² Körperoberfläche per os, an 4 Tagen einer Woche) angewendet werden und anstelle von Vincristin das **Cytosinarabinosid**.

Tabelle 2.5: Ausgewähltes Therapieprotokoll für die chronische lymphatische Leukämie beim Hund

p.o. = per os; i.v. = intravenös

Quelle: Modifiziert nach (Teske, 2005)

Zytostatikum	Dosierung	Tag der Gabe
Chlorambucil	0,2 mg/kg p.o.	Tag 1 bis Tag 21
Chlorambucil	0,1 mg/m ² p.o.	Tag 22 bis Tag 28
Vincristin	0,025 mg/kg i.v.	Tag 1, Tag 8 und Tag 15
Prednisolon	30 mg/m ² p.o.	Tag 1 bis Tag 7
Prednisolon	10 mg/m ² p.o.	Tag 8 bis Tag 14

Im Falle eines Nichtansprechens der Therapie können auch bei der CLL hoch-maligne Lymphom Protokolle (u.a. mit Doxorubicin, L-Asparaginase, Mercaptopurin) angewendet werden, jedoch sollte dies aufgrund der schlechten Prognose gut überlegt werden (Mischke, Hungerbühler et al., 2003)

Über das Purinanalogon Fludarabin, welches zu den Standardtherapeutika bei der Behandlung der CLL in der Humanmedizin gehört, gibt es beim Hund noch keine Angaben, aber hält die Hoffnung auf Therapie der CLL in der Zukunft aufrecht (Workman und Vernau, 2003).

3. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Wertigkeit von *in-vitro* Untersuchungen bezüglich des individuellen Ansprechens auf eine Chemotherapie bei Patienten mit Non-Hodgkin Lymphomen durchzuführen. Zur Testung wurden Humanpatienten mit chronischer lymphatische Leukämie (B-CLL) gewählt.

Als *in-vitro* Testsystem sollte der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay verwendet werden und als Auswertungsverfahren der Chemosensibilitätsindex C_i . Dieser Index wurde schon zuvor bei akuten Leukämien beschrieben und sollte nun erstmals bei der Therapievorhersage bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell Typ angewendet werden.

Es sollte zudem geprüft werden, ob andere mögliche Routineparameter in der Lage sind, gleichwertige Vorhersagen des Therapieansprechens zu erreichen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Patientenmaterial

Es wurde ausschließlich Zellmaterial von an Chronischer Lymphatischer Leukämie (CLL) erkrankten Personen verwendet. Die CLL musste histologisch/immunologisch gesichert und vom B-Zell-Typ (B-CLL) sein.

Das Patientenmaterial wurde im Rahmen folgender offenen multizentrischen randomisierten Phase III-Therapiestudie gewonnen: *Bendamustin vs. Fludarabin als 2nd-line Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie im Stadium Binet B + C / Rai II - IV*. Die Leitung dieser Studie lag bei Prof. Dr. N. Niederle¹. Die Biostatistische Betreuung und Randomisation übernahm Dr. Axel Hinke von der Wissenschaftlichen Service Pharma GmbH (WiSP)².

Das Studienziel war, in der Rezidivtherapie der chronischen lymphatischen Leukämie nach Vorbehandlung mit einem Alkylans (mit/ohne Steroiden) eine Monotherapie mit Bendamustin im Vergleich mit einer Therapie mit Fludarabin zu untersuchen.

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden im Rahmen der Begleitforschung dieser Therapiestudie durchgeführt. Insgesamt 25 deutschlandweite hämatoonkologische Zentren stellten hierfür Blutproben der eingeschlossenen Patienten zur Verfügung. Zusätzlich wurde das Blut von B-CLL Patienten der Universitätsklinik zu Köln im Rahmen der Routinediagnostik untersucht.

Die Patienten hatten zum Zeitpunkt der Blutabnahme noch keine bzw. höchstens eine Vorbehandlung erhalten (Ausnahme sieben Patienten der Universitätsklinik zu Köln mit mehrfacher Vorbehandlung). Zudem mussten die Personen mindestens 18 Jahre alt sein und noch eine voraussichtliche Lebenserwartung von mindestens 3 Monaten haben. Frauen im gebärfähigen Alter mussten einen negativen Schwangerschaftstest vorweisen.

Im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Leukämiediagnostik wurden dem Patienten mit dessen Einverständnis ca. 15 ml heparinisiertes peripheres Blut mittels Venenpunktion entnommen. Das Material wurde bei Raumtemperatur gelagert und unmittelbar bzw. nach Eintreffen als Postzuwendung höchstens 24 Stunden ab Entnahme aufgearbeitet.

¹ Leiter der Medizinischen Klinik III, Klinikum Leverkusen, Am Gesundheitspark 11, 51375 Leverkusen

² WiSP Wissenschaftlicher Service Pharma GmbH, Karl-Benz-Str. 1, 40764 Langenfeld

4.1.2 Entenblut

Das Entenblut wurde im Rahmen von Nutztierschlachtungen direkt am Schlachthof entnommen und sofort mit 1000 Einheiten/ml Heparin versetzt. Zur weiteren Aufbearbeitung wurde das Blut ins Labor gebracht.

4.1.3 Zytostatika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zytostatika verwendet:

- Bendamustin; Ribomustin[®] (Fa. Ribosepharm GmbH, München)
- Chlorambucil 250 mg als Pulver (Fa. Fluka, Schweiz)
- Cladribin (2cda); Leustatin[®] (Fa. Janssen-Cilag GmbH, Neuss)
- Doxorubicin; Adriblastin[®] (Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen)
- Fludarabin; Fludara[®] (Fa. Schering, Berlin)
- Mitoxantron (DHAD); Novantron[®] (Fa. Wyeth Pharmacia GmbH, Münster)
- Prednison; Prednisolut[®] (Fa. Jenapharm, Jena)
- Vincristin (VCR), Vincristinsulfat 5 Gry[®] (Fa. GRY-Pharma GmbH, Kirchzarten)

4.1.4 Lösungen

Folgende Lösungen wurden für die *in-vitro* Testungen angesetzt.

RPMI 1640 mit 20 % foetalem Kälberserum (FKS)

20% (v/v)	FKS	(Fa. Biochrom AG, Berlin)
100 U/ml	Penicillin	(Fa. Biochrom AG, Berlin)
100 µg/ml	Streptomycin	(Fa. Biochrom AG, Berlin)
10 mM	Herpes-Puffer	(Fa. Gibco, Paisley, Schottland)
gelöst in 500 ml RPMI 1640-Medium		(Fa. Biochrom Ag, Berlin)

Das verwendete FKS wurde bei -18°C gelagert. Vor dem Gebrauch wurde es 30 Minuten im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert.

Nigrosin/Fast-Green-Farbstoff

1% (w/v)	Fast Green	(Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
0,5% (w/v)	Nigrosin	(Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
gelöst in 500 ml PBS (phosphate-buffered saline)		(Fa. Gibco, Paisley, Schottland)

Die Lösung wird vier Stunden mittels Magnetrührer gerührt und anschließend werden die nicht gelösten Bestandteile mittels Zentrifugation bei 4000 Upm für 30 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde mittels eines Sterilfilters (Bottle-top-filters, Falcon, Becton-Dickinson, Basel) mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert.

Nigrosin/Fast-Green/Entenerythrozyten-Lösung

Jeweils frisch vor Gebrauch wurde der Nigrosin/Fast-Green-Farbstoff in einem Verhältnis von 17:3 mit der Entenerythrozytenlösung vermischt.

4.2 Methoden

4.2.1 Separation mononukleärer Zellen

Zur Separation werden Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit Filterscheibe verwendet (Leucosep® Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen). Das Patientenmaterial wurde mit dem gleichen Volumen auf 37°C vorerwärmtem RPMI 1640 (Fa. Biochrom AG, Berlin) versetzt und anschließend auf 15 ml Lymphoprep (Fa. Nycomed, Oslo, Norwegen) aufgelegt. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 2000 Upm wurden die mononukleären Zellen aus der Interphase oberhalb des Lymphopreps entnommen. Die Zellen wurden zweimal mit 25 ml RPMI 1640 gewaschen. Nach Resuspension der Zellen, wurden diese für 10 Minuten bei 1000 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden anschließend in RPMI 1640 mit 20 % FKS resuspendiert und eine Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt.

4.2.2 Herstellung einer Entenerythrozyten (DRBC)-Stocklösung

20 ml heparinisiertes Entenblut wurde 15 Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Insgesamt wurden die Entenerythrozyten viermal gewaschen, indem das Sediment jeweils in 20 ml isotoner NaCl-Lösung (150 mM) resuspendiert und anschließend bei 1000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das Sediment wurde schrittweise in 200 ml einer 2 % (w/v) Paraformaldehyd-PBS Lösung resuspendiert und anschließend 6 Tage bei 4°C mittels Magnetrührer gerührt. Nach erneuter Zentrifugation bei 100 Upm für 10 Minuten wird das Sediment in 25 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 25 ml 18 % (v/v) Triton X-100/PBS (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wird der Ansatz 15 Minuten inkubiert. Eine weitere Inkubation erfolgt nach Zugabe von 400 ml EtOH (reinst) über Nacht bei 4°C. Die Entenerythrozyten werden anschließend wiederholt wie oben beschrieben gewaschen. Zum Auftrennen von Erythrozytenaggregaten wird der Ansatz für zwei Stunden im Ultraschallbad bei höchstens 20°C behandelt. Nach erneuter Zentrifugation werden die Erythrozyten in einer Endkonzentration von 10^7 Zellen/ml in NaCl-Lösung (150 mM) mit 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin (Fa. Biochrom AG, Berlin) und 1 µg/ml Amphotericin B (Fa. Bristol-Myers Squibb, München) resuspendiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

4.2.3 Herstellung von Zytostatikallösungen

Die Zytostatikallösungen wurden nach den Vorschriften des Herstellers mit dem jeweiligen Lösungsmittel gelöst. Die weiteren Verdünnungsschritte zur Einstellung der gewünschten

Konzentrationen erfolgten mit RPMI 1640 (Fa. Biochrom AG, Berlin). Die Zytostatikastocklösungen wurden als Zehnfachkonzentrationen angesetzt, um nach der Zugabe der Zellsuspension die erforderliche Endkonzentration zu erhalten. Jedes Zytostatikum wurde in fünf abgestuften Konzentrationen hergestellt, wobei die mittlere Konzentration jeweils dem klinisch relevanten steady - state Plasmaspiegel entsprach. Dieser wurde den Fachinformationen der verschiedenen Zytostatika entnommen (siehe Anhang). Die Zytostatikastocklösungen wurden in Portionen zu jeweils 20 µl in Micronic - Röhrchen (Linbro® Tubes; Fa. ICN Biomedicals B.V., Amsterdam) aufgeteilt und diese mittels Strips (Capband 8; Fa. ICN Biomedicals B.V., Amsterdam) steril verschlossen. Die Stocklösungen wurden bei -20°C für höchstens drei Monate gelagert. Die einzelnen Ansätze wurden jeweils direkt vor der Benutzung aufgetaut und ohne Verzug mit der Zellsuspension versetzt.

Tabelle 4.1: *Getestete Zytostatika mit den jeweiligen fünf eingesetzten Endkonzentrationen*

Zytostatikum	Endkonzentrationen (µg/ml)				
	I	II	III	IV	V
Bendamustin	20	6,667	2,22	0,74	0,247
Chlorambucil	0,5	0,167	0,056	0,018	0,006
Cladribin	0,2	0,05	0,012	0,003	0,0008
Doxorubicin	1	0,166	0,028	0,005	0,0008
Fludarabin	5	1,66	0,55	0,185	0,061
Mitoxantron	0,5	0,167	0,055	0,018	0,006
Prednisolon	2,5	0,625	0,156	0,039	0,009
Vincristin	1	0,33	0,11	0,037	0,012

4.2.4 Herstellung kollagenbeschichteter Objektträger

Auf einen sauberen, staubfreien Objektträger wurde ein Tropfen Kollagen (2 mg/ml in 0,1 % Essigsäure, Fa. Serva, Heidelberg) und ein halb so großer Tropfen einer 6 % (w/v) NaCl-Lösung aufgebracht und mit einem zweiten ebenfalls sauberen und staubfreien Objektträger verstrichen. Die Beschichtung wurde durch Lufttrocknung fixiert.

4.2.5 Gegenfärbung nach Pappenheim

Die Objektträger werden fünf Minuten in May-Grünwald-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) inkubiert. Danach werden die Objektträger in ein 1:1 Gemisch von May-Grünwald-Lösung und Weise-Puffer (pH 7,2; Fa. Merck, Darmstadt) überführt und wieder für fünf Minuten inkubiert. Anschließend werden die Objektträger für 15 Minuten in einem 1:9 Gemisch von Giemsa-Lösung (Fa. Merck, Darmstadt) und Weise-Puffer inkubiert. Nach abschließendem kurzen Spülen in destilliertem Wasser werden die Objektträger luftgetrocknet. Die Deckgläser werden mittels dem Eindeckmittel Neo-Mount® (Fa. Merck, Darmstadt) aufgebracht.

4.2.6 Differential Staining Cytotoxicity (DiSC) Assay

Für jeden Testansatz wurden 180 µl einer $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml-Lösung mit 20 µl der jeweiligen Zytostatikastocklösung versetzt und in Micronicröhrchen (Fa. ICN Biomedicals B.V., Amsterdam) bei 37°C und 5 % CO₂ für 96 Stunden inkubiert. Alle Ansätze wurden im Doppelansatz durchgeführt. Als Kontrolle wurden sechs Ansätze ausschließlich mit 20 µl RPMI 1640 ohne Zytostatika versetzt.

Nach Ablauf der 96 Stunden wurden die Testansätze mit 200 µl Nigrosin/Fast-Green/Entenerythrozyten-Lösung vermischt und auf einem Rüttler für 10 Minuten inkubiert. Je 100 µl des Ansatzes wurden mittels Zytozentrifugation in einer Cytospin-3 Zentrifuge (Fa. Shandon, Frankfurt am Main) bei 1000 Upm für 1 Minute auf kollagenbeschichtete Objektträger aufgebracht und luftgetrocknet. Nach der Lufttrocknung erfolgte die Gegenfärbung nach Pappenheim.

Bei der mikroskopischen Auswertung der Objektträger (siehe Abb. 4.1 und 4.2) wurden bei den Kontrollansätzen die Entenerythrozyten (DRBC), die vitalen Zellen der normalen Hämatopoese (VC), die vitalen Tumorzellen (VTC) und die toten Zellen (DC) gezählt. Es wurden pro Objektträger so lange ganze Gesichtsfelder gezählt, bis mindestens 100 DRBC gezählt waren. Unterhalb einer Gesamtvitalität von 30 % wurde der Versuch abgebrochen. Bei den Ansätzen mit Zytostatikainkubation wurden ausschließlich die vitalen Tumorzellen (VTC) und die Entenerythrozyten (DRBC) ausgezählt.

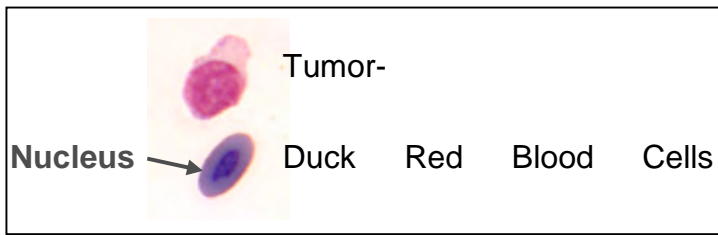


Abb. 4.1: *Mikroskopischer Blick auf eine Tumorzelle und einen Entenerythrozyten*

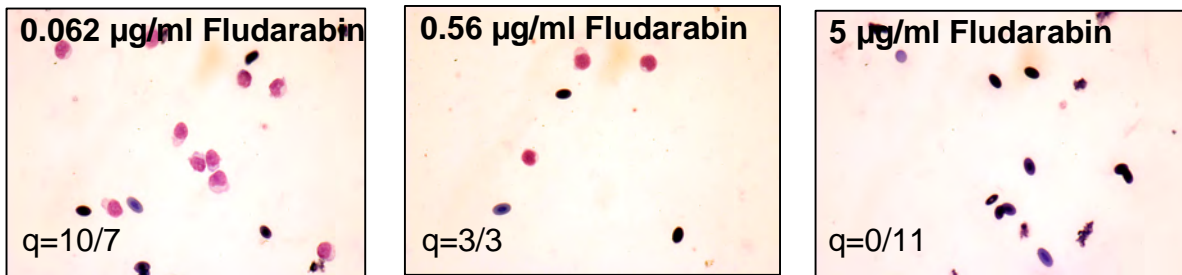


Abb. 4.2: *Mikroskopische Betrachtung der Objektträger bei drei aufsteigenden Konzentrationen des Zytostatikums Fludarabine*

4.3 Statistische Methoden

Die Datenberechnung und Auswertung erfolgte rechnerunterstützt unter Verwendung der Software MS Office® Programm Excel® (Microsoft Corp.), sowie SPSS 11.0 (SPSS Inc.) und GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.).

Des Weiteren stand zur Auswertung des DiSC Assays das Leuk-Programm zur Verfügung. Dabei handelt es sich um eine in MS DOS programmierte Spezialsoftware, welche in der Arbeitsgruppe Dr. Schinköthe entwickelt wurde.

4.3.1 Auswertungen des DiSC Assay

Die Auswertung erfolgt bei dieser Studie anhand des Chemosensibilitätsindex C_i . Zuerst muss aber die Zellvitalität und das Tumorzellüberleben (TCS) bestimmt werden. Durch graphische Darstellung der TCS Daten entsteht die Dosis-Wirkungskurve und somit die Fläche unter der Kurve (AUC). Die AUC Daten dienen als Ausgangspunkt zur Berechnung des Chemosensibilitätsindex C_i .

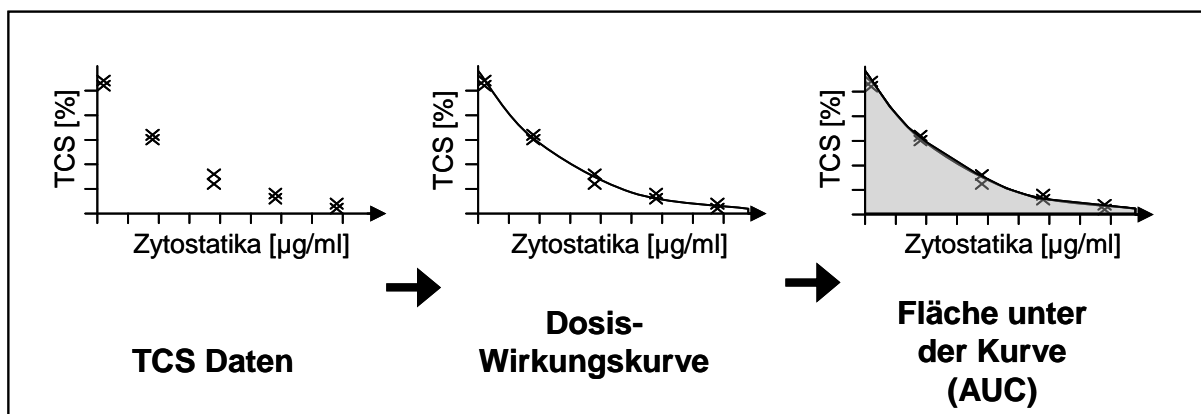


Abb. 4.3:

Graphische Darstellung zur Berechnung der AUC Daten

Vitalitätsbestimmung

Nach der mikroskopischen Auszählung der Zellen, wird die Zellvitalität bestimmt. Für einen verwertbaren Test muss diese bei mindestens 30 % liegen. Die Zellvitalität V der Kontrolle errechnet sich wie folgt:

$$Vitalität(V) = \frac{(VC + VTC) * 100}{(VC + VTC + DC)} \%$$

Legende: VC *vitale Zellen der normalen Hämatopoese*
 VTC *vitale Tumorzellen*
 DC *tote Zellen*

Berechnung des Tumorzellüberlebens

Zur Ermittlung des Tumorzellüberlebens (Tumor Cell Survival, TCS) muss zuerst für jede Einzelinkubation der Quotient q errechnet werden. Dieser quantifiziert das Verhältnis der vitalen Tumorzellen zu den gleichzeitig gezählten Entenerythrozyten.

$$Quotient(q) = \frac{VTC}{DRBC}$$

Legende: VTC *vitale Tumorzellen*
 $DRBC$ *Entenerythrozyten*

Zur weiteren Berechnung muss aus den Kontrollansätzen der Mittelwert $q_{\text{Kontrolle}}$ der Quotienten errechnet werden. Dieser Mittelwert wird in Relation zu den q -Werten der Zytostatika gesetzt. Der Quotient wird als Tumorzellüberleben (Tumor Cell Survival, TCS) bezeichnet und wie folgt errechnet:

$$TCS = \frac{q_{\text{Zytostatikum}} * 100}{q_{\text{Kontrolle}}} \%$$

Legende: TCS *Tumor Cell Survival, relatives Tumorzellüberleben in Prozent*

Der TCS gibt Auskunft darüber, wie viele Tumorzellen *in-vitro* bei einem Zytostatikum in der entsprechenden getesteten Konzentration im Verhältnis zu einem reinen Nährmedium überlebt haben.

Dosis-Wirkungsfunktion

Die TCS Werte werden auf der Ordinate gegen die getesteten Zytostatikakonzentrationen auf der Abszisse grafisch aufgetragen. Somit erhält man die Dosis-Wirkungskurve. Mittels linearer Regression werden die TCS Werte in die Dosis-Wirkungsfunktion transformiert. Zuvor müssen die TCS Werte logarithmiert werden, um eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Wirkung zu erreichen. Die Dosis-Wirkungsfunktion lautet:

$$TCS_{(Konz)} = e^{dist + rise * Konz}$$

Legende:	<i>TCS</i>	<i>Tumor Cell Survival, relatives Tumorzell-Überleben</i>
	<i>Konz</i>	<i>Konzentration des jeweiligen Zytostatikums</i>
	<i>e</i>	<i>Eulersche Zahl</i>
	<i>dist</i>	<i>Achsenabstand der zugrunde liegenden linearen Funktion</i>
	<i>rise</i>	<i>Steigerung der zugrunde liegenden linearen Funktion</i>

Fläche unter der Kurve (AUC)

Eine geeignete Maßzahl für die Dosis-Wirkungsfunktion ist die Fläche unter der Dosis-Wirkungskurve (AUC, Area under the curve). Diese Fläche gibt einen Wert für die gesamte Dosis-Wirkungskurve wieder. Je kleiner die Fläche unterhalb der Funktion ist, umso wirkungsvoller war das verwendete Zytostatikum.

Die Fläche unterhalb der Dosis-Wirkungskurve entspricht dem ersten Integral der Funktion und ist definiert als:

$$AUC = \frac{e^{dist}}{|rise|}$$

Legende:	<i>AUC</i>	<i>Fläche unter der Kurve, Area under the curve</i>
	<i>e</i>	<i>Eulersche Zahl</i>
	<i>dist</i>	<i>Achsenabstand der zugrunde liegenden linearen Funktion</i>
	<i>rise</i>	<i>Steigung der zugrunde liegenden linearen Funktion; ist rise = 0, dann ist AUC = ∞</i>

Die ermittelten AUC Werte haben die theoretische Einheit *Konzentration × TCS (%)*. Daraus folgt, dass die AUC Werte nicht direkt von einem Zytostatikum auf ein anderes übertragbar

sind, da die Konzentration eines Zytostatikums nicht auf die Konzentration eines anderen Zytostatikums umzurechnen ist.

Chemosensibilitätsindex C_i

Um eine Vergleichbarkeit der Zytostatika untereinander zu ermöglichen, wurden die AUC Werte in einen Index für die Wirkungswahrscheinlichkeit transformiert, den Chemosensibilitätsindex C_i . Er ist folgendermaßen definiert:

$$C_i = e^{-AUC * C_k}$$

Legende:

C_i	Chemosensibilitätsindex
e	Eulersche Zahl
AUC	Fläche unter der Kurve, Area under the curve
C_k	substanzspezifische Konstante

Da der Exponent $-AUC * C_k$ zwischen 0 und $-\infty$ beschränkt ist, ergibt sich für C_i ein Gültigkeitsbereich von $0 \leq C_i \leq 1$. Durch die substanzspezifische Konstante C_k wird der C_i so justiert, dass bei einem $C_i \leq 0,5$ eine Resistenz gegen die Substanz vorhergesagt wird und bei einem $C_i > 0,5$ eine Sensibilität.

Die Konstante C_k muss für jedes Zytostatikum wie folgt einzeln berechnet werden:

$$C_k = -\frac{\ln(0,5)}{AUC_{Cut-off}}$$

Legende:

C_k	substanzspezifische Konstante
\ln	Logarithmus
AUC	Fläche unter der Kurve, Area under the curve
Cut-Off	kleinster AUC Wert eines klinisch resistenten Patienten

Die Eichung der Konstante C_k und somit des Chemosensibilitätsindex C_i muss für jedes Zytostatikum getrennt vorgenommen werden. Dazu wird jeweils der Gesamtpool an therapie-refraktären Patienten einer Substanz betrachtet. Der kleinste erreichte AUC Wert dieser Substanzgruppe wird als Grenzwert zwischen Sensibilität und Resistenz definiert und einem C_i Wert von 0,5 zugewiesen.

4.3.2 Verwendete statistische Tests

Bei allen in dieser Studie verwendeten statistischen Testverfahren wurde die Benennung von Signifikanzen wie folgt angewendet:

$p \leq 0,05$	signifikant
$p > 0,05$	nicht signifikant

Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein parameterfreier Homogenitätstest für zwei unverbundene Stichproben. Der Test prüft, ob zwei unabhängige Verteilungen zu derselben Grundgesamtheit gehören.

Jonkheere-Terpstra-Test

Mit Hilfe des Jonkheere-Terpstra-Tests kann geprüft werden, ob mehrere unabhängige Stichproben aus der selben Grundgesamtheit stammen. Dieser Test setzt voraus, dass eine natürliche *a-priori*-Ordnung (aufsteigend oder absteigend) der Grundgesamtheiten besteht.

Pearson's Chi-Quadrat (χ^2) -Test

Beim χ^2 -Test werden die beobachteten und erwarteten Häufigkeiten in allen Kategorien miteinander verglichen. Dadurch wird überprüft, ob alle Kategorien den gleichen Anteil an Werten enthalten.

Überlebensanalyse nach Kaplan-Meier

Das Kaplan-Meier-Model basiert auf der Schätzung bedingter Wahrscheinlichkeiten zu jedem Zeitpunkt eines auftretenden Ereignisses und durch Bilden des Produktgrenzwertes dieser Wahrscheinlichkeiten zur Schätzung der Überlebensrate zu jedem Zeitpunkt. Durch diese Methode können Faktoren untereinander verglichen werden, die Einfluss auf das Überleben haben. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wird über den **Log-Rank-Test** ausgewertet. Der Log-Rank-Test vergleicht die Gleichheit der Überlebensverteilung. Alle Zeitpunkte werden in diesem Test gleich gewichtet (Schinköthe, 2001).

Receiver Operating Characteristics (ROC)-Analyse

Die ROC-Analyse wurde im 2. Weltkrieg zur Rauschunterdrückung in der Radartechnik entwickelt. Sie ermöglicht es, das Verhalten von Diagnose-Systemen zu analysieren und zu visualisieren. Das Verfahren wurde bereits 1960 in der Medizin eingesetzt und hat sich vor allem als Analyseverfahren in der Krankheitsdiagnostik etabliert (Stiene, 2006).

Zur Evaluation eines quantitative diagnostischen Tests werden die Spezifität (relative Häufigkeit aller richtig negativen Testergebnisse) und die Sensitivität (relative Häufigkeit aller richtig positiven Testergebnisse) herangezogen. Diese sind von einem Schwellenwert abhängig (Cut-off Punkt). Durchläuft der Schwellenwert den gesamten Bereich möglicher Testwerte, und wird jeweils die geschätzte Sensitivität gegen die geschätzte Spezifität aufgetragen, so entsteht die sogenannte empirische ROC-Kurve (Jensen und Schäfer, 1996).

Unter dieser Kurve befindet sich eine Fläche, deren Maß quantifiziert die Wahrscheinlichkeit, ob ein Test fähig ist, zwischen positiven und negativen Ergebnissen, zu unterscheiden. Ein schlechter Test hat einen Flächenwert von 0,5 und ein perfekter Test hat einen Flächenwert von 1,0. Der optimale Schwellenwert ist der Punkt mit der höchsten Sensitivität und Spezifität.

4.4 Erfassung der therapeutischen Effektivität

Die Festlegung der Beurteilungskriterien erfolgt nach der National Cancer Institute-sponsored (NCI) Working Group (Cheson, Bennett et.al., 1996). Zur Beurteilung sind eine körperliche Untersuchung, ein Blutbild und eine Knochenmarkuntersuchung notwendig.

Komplette Remission (CR)

Eine komplette Remission liegt vor, wenn für mindestens zwei Monate folgende Kriterien erfüllt sind:

- keine vergrößerten Lymphknoten mehr nachweisbar (durch körperliche Untersuchung und entsprechende bildgebende Untersuchungen)
- keine Hepato-, Splenomegalie
- keine Krankheitssymptome
- normales Blutbild charakterisiert durch: absolute Lymphozytenzahl $\leq 4.000/\mu\text{l}$, Neutrophile $\geq 1.500/\mu\text{l}$, Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$ und Hämoglobin $> 11 \text{ g/dl}$ (ohne Bluttransfusion)
- Knochenmark: $< 30 \%$ Lymphozyten, Histologie ohne noduläre Infiltrate

Partielle Remission (PR)

Eine partielle Remission liegt vor, wenn für mindestens zwei Monate folgende Kriterien erfüllt sind:

- Verminderung der peripheren Lymphozytenzahl um $\geq 50 \%$ **plus**
- Rückbildung der Lymphknotenvergrößerung um $\geq 50 \%$ und/oder
- Rückbildung einer Hepato- und/oder Splenomegalie um $\geq 50 \%$ **plus**
- mindestens eins der folgenden Kriterien:
 - o Neutrophilie $\geq 1.500/\mu\text{l}$ oder $\geq 50 \%$ Verbesserung des Ausgangswertes
 - o Thrombozyten $> 100.000/\mu\text{l}$ oder $\geq 50 \%$ Verbesserung des Ausgangswertes
 - o Hämoglobin $> 11\text{g/dl}$ oder $\geq 50 \%$ Verbesserung des Ausgangswertes

Progression (PD)

Eine Progression liegt vor, wenn mindestens eins der folgenden Kriterien erfüllt ist:

- Zunahme des Durchmessers zweier vergrößerter Lymphknoten um $\geq 100 \%$ an zwei aufeinander folgenden Untersuchungen im Abstand von mindestens zwei Monaten. Einer der Lymphknoten sollte dabei einen Durchmesser von mindestens 2 cm aufweisen.

- Auftreten neuer pathologischer Lymphknotenvergrößerungen (mindestens 2 cm im Durchmesser).
- Sonographisch gemessene Größenzunahme von Leber und/oder Milz von $\geq 50\%$. Auftreten einer eindeutigen, vorher nicht nachweisbaren Hepato- oder Splenomagalie (Größe konstant 10 % über der Norm).
- Dauerhafter Anstieg der absoluten Lymphozytenzahlen um $\geq 100\%$ (= Verdopplung).
- Transformation in ein hochmalignes NHL (Richter-Syndrom) oder in eine Prolymphozytenleukämie ($> 55\%$ Prolymphozyten).
- Übergang von Stadium A nach B oder C oder von Stadium B nach C.

Stabiler Krankheitsverlauf (SD) / no change (NC)

Eine stabile Erkrankung liegt vor, wenn die Kriterien für komplette Remission, Teilremission und Progression nicht erfüllt sind.

5. Ergebnisse

5.1 Deskriptive Statistik

5.1.1 Probenaufkommen

Im Zeitraum von September 2001 bis Juni 2005 wurden für die vorliegende Arbeit 93 Blutproben von 89 Patienten, welche an chronischer lymphatischer Leukämie erkrankt waren, mit dem Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay getestet (siehe Tab.5.1). Das *in-vitro* Chemosensibilitätsprofil wurde bei 90 der Proben von 86 Patienten (96,8 %) erfolgreich ermittelt. Aufgrund einer bakteriellen Kontamination und somit einer zu geringen Anzahl an vitalen Tumorzellen, konnten drei Proben (3,3 %) nicht durch den DiSC-Assay ausgewertet werden.

Eine klinische Korrelation war bei 69 (76,7 %) der insgesamt 90 Proben von 66 Patienten der insgesamt 86 Patienten möglich. Die klinischen Daten der Studienpatienten wurden durch die Wissenschaftliche Service Pharma GmbH (WiSP)¹ zur Verfügung gestellt.

Lediglich bei der Betrachtung der Bendamustin-Sensibilität (siehe Kapitel 5.4) wurden 14 zusätzliche *in-vitro* Chemosensibilitätsprofile von Patienten außerhalb der Studie, aber ebenfalls mit diagnostizierter B-CLL hinzugenommen. Dieses Patientenmaterial stammte von Patienten der Universitätsklinik zu Köln aus dem Zeitraum 1999 bis 2001.

Tabelle 5.1: Proben- und Patientenanzahl der durchgeführten DiSC Assays

^a 3 (3,3%) DiSC Assays nicht auswertbar aufgrund bakterieller Kontamination

	Proben	Patienten
Rekrutierungszeitraum	September 2001 – Juni 2005	
Durchgeführte DiSC-Assays	93	89
Auswertbare DiSC-Assays	90 (96,8%) ^a	86 (96,6%)
Klinische Korrelation	69 (76,7%)	66 (76,7%)

¹ Wissenschaftlicher Service Pharma GmbH (WiSP), Karl-Benz-Str.1, 40764 Langenfeld

5.1.2 Patientenkollektiv

Von den 89 untersuchten Patienten lagen zum Ende der Beobachtungszeit (31.05.2006) die klinischen Daten von 66 Patienten vor (77 %). Von diesen 66 Patienten waren 47 (71 %) männlich und 19 (29 %) weiblich. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren die Patienten zwischen 39 und 83 Jahren alt. Das mittlere Alter lag bei 64,8 Jahren (Median 66 Jahre).

28 (44 %) dieser Patienten waren im Stadium Binet B und 36 (56 %) in Binet C. Vor der *in-vitro* Testung wurde bei sechs der Patienten (9 %) keine zytostatische Chemotherapie durchgeführt. Bei der Mehrzahl der Patienten (59 Patienten / 89 %) erfolgte eine Vorbehandlung mit dem Alkylans Chlorambucil. Bei 17 dieser Patienten (26 %) wurde zusätzlich Prednisolon verabreicht. Sieben Patienten (11 %) wurden mit anderen Zytostatika, aber nicht mit Alkylanzien vorththerapiert. Bei jeweils fünf dieser sieben Patienten gab es eine Vortherapie mit Fludarabin und/oder Bendamustin, bei dreien mit Mitoxantron und bei einem Patienten mit Cyclophosphamid (Tabelle 5.2).

Nachdem die Blutabnahme zur *in-vitro* Chemosensibilitätstestung erfolgte, wurden 25 der Patienten mit Fludarabin (38 %) und 28 mit Bendamustin (42 %) behandelt. 13 der Patienten (20 %) erhielten eine andere Chemotherapie. Fünf dieser Patienten wurden mit der Kombination Fludarabin plus Cyclophosphamid (FC) behandelt, vier Patienten erhielten neben einer Fludarabintherapie noch den Antikörper Alemtuzumab (FluCam), drei Patienten wurden mit Chlorambucil weiter therapiert und ein Patient erhielt die Polychemotherapie R-CHOP (Rituximab plus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison). Bei den Therapien wurden vier bis acht Zyklen durchgeführt (Median sechs Zyklen).

Das klinische Ansprechen auf die Chemotherapie war nach den NCI-Kriterien (NCI: Amerikanisches nationales Krebsinstitut) wie folgt verteilt: zwölf der Patienten (18 %) konnten eine komplette Remission vorweisen; die Mehrzahl, nämlich 39 der Patienten (59 %) hatte eine partielle Remission; zehn der Patienten (15 %) zeigten keine Krankheitsveränderungen (SD: stabiler Krankheitsverlauf) und bei fünf der Patienten (8 %) kam es zu einer Progression der Erkrankung.

Nach Therapieabschluss wurden die Patienten 3 bis 45 Monate beobachtet. Die mittlere Beobachtungszeit lag bei 15 Monaten (Median 12,5 Monate). Letzter Beobachtungstag war der 31.05.2006. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes wurde bei 32 der Patienten (49 %) ein Rezidiv diagnostiziert. Die progressfreie Zeit lag bei diesen Patienten zwischen 0 bis 39 Monaten. Im Mittel lag sie bei 10,2 Monaten (Median 7,5 Monate).

Während der Beobachtungszeit verstarben 17 der Patienten (27 %). Zehn dieser Patienten (59 %) aufgrund ihrer Erkrankung an chronischer lymphatischer Leukämie, zwei aufgrund einer weiteren Tumorerkrankung und jeweils ein Patient an einem Apoplex, einer Hirnblutung, einem Myokardinfarkt, einer Herzinsuffizienz und an einem Virusinfekt.

Tabelle 5.2: Charakteristika des Patientenkollektivs^a andere Zytostatika: Fludarabin, Bendamustin, Mitoxantron, Cyclophosphamid^b andere Chemotherapie: FC, FluCam, Chlorambucil, R-CHOP

	Patientencharakteristika
Anzahl	66
männlich / weiblich	47 / 19 (71,2% / 28,8%)
Alter (Jahre) Mittelwert Median	39 – 83 64,8 66
Stratifikation: Binet B / Binet C	28 / 36 (43,8% / 56,3%)
Vorbehandlung keine Chlorambucil Prednisolon andere Zytostatika ^a	6 (9,1%) 59 (89,4%) 17 (25,8%) 7 (10,6%)
Therapiegruppen Fludarabin Bendamustin andere Chemotherapie ^b	25 (37,9%) 28 (42,4%) 13 (19,7%)
Klinisches Ansprechen Komplette Remission (CR) Partielle Remission (PR) stabiler Krankheitsverlauf (NC) Progression (PD)	12 (18,2%) 39 (59,1%) 10 (15,2%) 5 (7,6%)
Beobachtungszeit (Monate) Mittelwert Median	3 – 45 15 12,5
Rezidiv/Progress: ja / nein	32 / 34 (48,5% / 51,5%)
Rezidiv/Progressfreiezeit (Monate) Mittelwert Median	0 – 39 10,2 7,5
verstorben: ja / nein	17 / 47 (26,6% / 73,4%)

5.1.3 Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben

Es wurde zur Wahrscheinlichkeitsberechnung das progressfreie Überleben mit dem Therapieansprechen korreliert. Dabei zeigte sich, dass die mittlere progressfreie Zeit der Patienten, welche eine komplette Remission erreichten, 32 Monate war. Die therapierefraktären Patienten (NC) hatten hingegen nur eine mittlere progressfreie Zeit von fünf Monaten. Die Patienten mit einem partiellen Ansprechen lagen mit 19 Monaten dazwischen.

Die Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben zwischen den Patienten mit kompletter Remission und denen mit partieller Remission waren signifikant ($p = 0,0422$). Zwischen den Patienten mit partieller Remission und den therapierefraktären Patienten ($p < 0,001$), sowie zwischen den Patienten mit kompletter Remission und den therapierefraktären Patienten ($p < 0,001$) waren die Unterschiede sogar höchst signifikant (Abb.5.1).

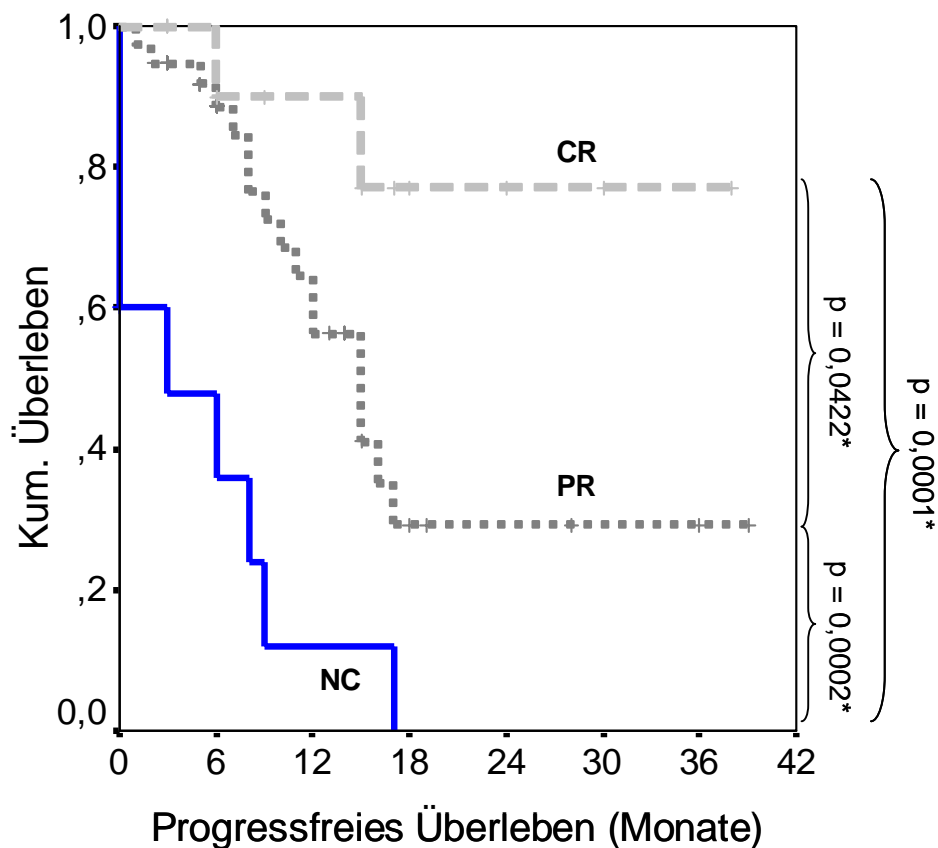


Abb. 5.1: *Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben aufgeteilt nach klinischem Ansprechen*

*Log-Rang Test: * = signifikanter Wert*

CR = komplette Remission; PR = partielle Remission; NC = therapierefraktäre Patienten

5.2 Chemosensibilitätsindex C_i

Zur Erstellung von *in-vitro* Chemosensibilitätsprofilen wurde innerhalb dieser Arbeit der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay verwendet. Als Auswertmethode wurde der Chemosensibilitätsindex C_i gewählt. Um dieses Verfahren zu verwenden, muss zuerst für jedes Zytostatikum eine Konstante C_k geeicht werden (Schinköthe, 2001).

5.2.1 Eichung

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich eine Eichung der C_k -Werte für die Zytostatika Fludarabin und Bendamustin vorzunehmen. Das Patientenkollektiv zur Eichung der C_k -Werte bestand aus insgesamt 53 Patienten. Dies entspricht einem Anteil von 80,3 % der gesamten Patienten. Das Eichungskollektiv erfüllt die Voraussetzungen entweder mit Fludarabin oder mit Bendamustin nach der Blutabnahme zur Testung therapiert worden zu sein und zusätzlich der Angabe des klinischen Ansprechens.

Zur Eichung des C_k -Wertes von Bendamustin wurden 28 Patienten verwendet. Vier (14,3 %) von diesen Patienten sprachen nicht auf die Therapie an. Bei dem Zytostatikum Fludarabin wurden 25 Patienten zur Eichung eingesetzt. Hier waren acht (32 %) Patienten resistent.

Durch die Anwendung des DiSC-Assays wurde für jeden Patienten ein AUC Wert ermittelt. Der jeweils kleinste AUC Wert der Patienten, welche nicht auf die Therapie angesprochen haben, wurde zur Eichung der jeweiligen Substanz verwendet und wird $AUC_{\text{Cut-Off}}$ genannt (siehe Tabelle 5.3).

Tab. 5.3: C_k -Werte und AUC_{CutOff} Werte von Bendamustin und Fludarabin

Die AUC_{CutOff} Werte geben die kleinste Fläche unterhalb der Dosis-Wirkungskurve der DiSC-Assay Ergebnisse von therapieresistenten Patienten an.

Zytostatikum	AUC_{CutOff}	C_k DiSC
Bendamustin	16916	$4,097 \cdot 10^{-5}$
Fludarabin	1914	$3,621 \cdot 10^{-4}$

5.2.2 Berechnung

Nach der Eichung der substanzspezifischen Konstante C_k , kann mit Hilfe der Formel $C_i = e^{-AUC \cdot C_k}$ für jeden aus dem DiSC-Assay ergebnen AUC Wert ein C_i Wert berechnet werden (Anhang Tabelle 10.1).

Durch die Berechnung des C_i Wertes lassen sich die Patienten in ihrem Ansprechen auf ein Zytostatikum in zwei Gruppen auftrennen (Abbildung 5.2 und 5.3). Die erste Gruppe besteht aus den Patienten, welche einen C_i Wert von größer als 0,5 aufweisen und somit nach der C_i -Vorhersage sensibel auf das Zytostatikum reagieren. Die zweite Gruppe von Patienten weist einen C_i Wert von kleiner oder gleich 0,5 auf, was laut Definition eine Resistenz vorhersagt. Auf diese Weise lässt sich für Bendamustin und für Fludarabin der Anteil derjenigen Patienten errechnen, welche nach C_i Wert Vorhersage auf das jeweilige Zytostatikum ansprechen würden. So ist bei allen 89 getesteten CLL Patienten eine *in-vitro* Sensibilität für Bendamustin für 74,4 % und für Fludarabin für 81,1 % der Patienten anzunehmen. Der mittlere C_i Wert von Bendamustin liegt bei 0,64 (Median 0,71) und von Fludarabin bei 0,75 (Median 0,84).

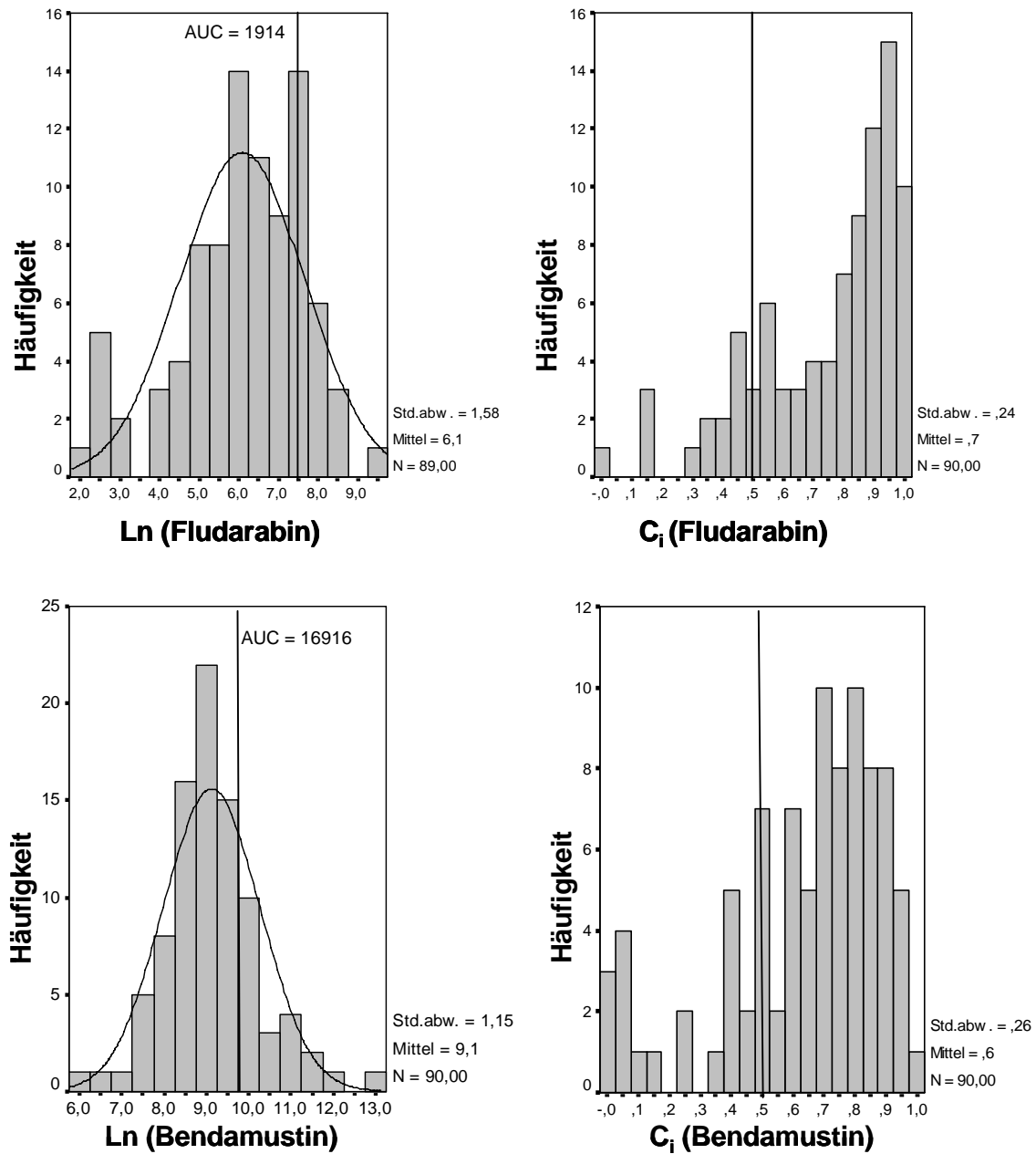


Abb. 5.2: Verteilung der AUC Daten von Fludarabin bzw. Bendamustin mit eingezeichneter Cut-Off-Fläche (AUC) und Verteilung der C_i Werte von Fludarabin bzw. Bendamustin mit eingezeichneter Grenze $C_i = 0,5$.

5.3 *In-vitro* / *in-vivo* Korrelation

Im folgenden Abschnitt wurde ein Vergleich zwischen den Ergebnissen des Chemosensibilitätsindex C_i und dem tatsächlichen klinischen Ansprechen durchgeführt. Dieses klinische Ansprechen ist definiert nach NCI-Kriterien und bezieht sich auf die Beobachtungszeit nach Beendigung der Chemotherapie.

5.3.1 Vergleich: „resistent“ versus „sensibel“

Durch Anwendung des Chemosensibilitätsindex C_i wurde eine Vorhersage getroffen, welche Patienten „sensibel“ (C_i Wert $> 0,5$) bzw. „resistent“ (C_i Wert $\leq 0,5$) auf das jeweilige Zytostatikum reagieren. Zudem wurde das wirkliche klinische Ansprechen ebenfalls in diese beiden Gruppen unterteilt. Komplette und partielle Remission wurden hierbei als „sensibel“ definiert und ein stabiler Krankheitsverlauf sowie eine Progression als „resistent“ eingestuft. Beim Vergleich der beiden Ergebnisse zeigte sich für die klinisch als „sensibel“ eingestuften Patienten ein mittlerer C_i Wert von 0,77 (Median 0,79) und für die klinisch „resistenten“ Patienten ein Mittelwert von 0,40 (Median 0,40). Durch die Korrelation mittels Mann-Whitney-U-Test wird ein hoher signifikanter Unterschied deutlich ($p < 0,001$; Tab.5.4 und Abb.5.3).

Tabelle 5.4: *Korrelation der C_i Werte von Bendamustin und Fludarabin aufgeteilt nach klinischem Ansprechen „sensibel“ und „resistent“.*

*Mann-Whitney-U-Test: * = signifikanter Wert*

Klinisches Ansprechen	Proben-Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	p-Wert
sensibel	41	0,50	0,99	0,77	0,79	<0,0001*
resistent	12	0,25	0,50	0,40	0,40	

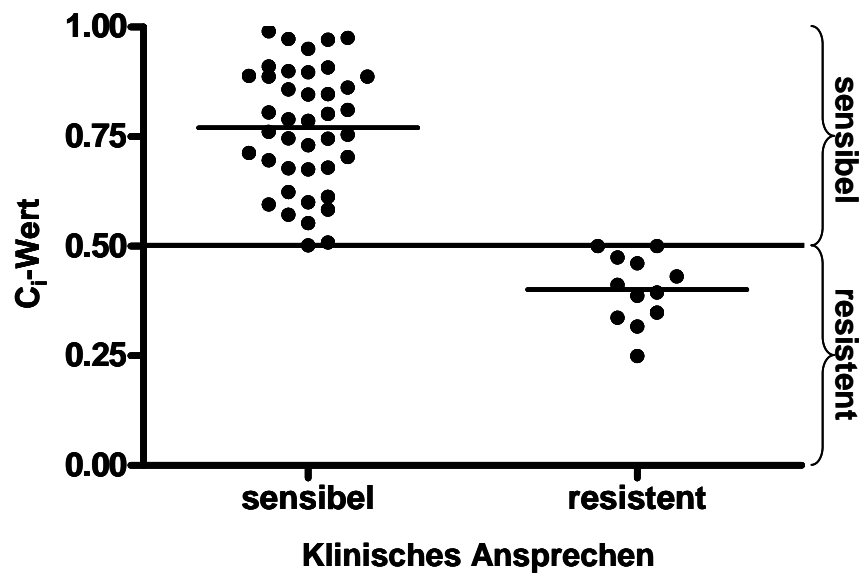


Abb. 5.3: Verteilung der C_i Werte von Bendamustin und Fludarabin aufgeteilt nach klinischem Ansprechen „sensibel“ und „resistent“ mit Angabe der Mittelwerte und eingezeichneter C_i Vorhersagegrenze C_i = 0,5.

Beim Vergleich der Ergebnisse mittels Vierfeldertafel (Tabelle 5.5) zeigt sich, dass bei allen 53 Patienten das Ansprechen richtig vorhergesagt wurde. Dies entsprach einer richtigen Vorhersagewahrscheinlichkeit von 100%. Der Zusammenhang zwischen *in-vitro* Vorhersage mittels C_i Wert und dem wirklichen klinischen Ansprechen war nach Pearson’s Chi-Quadrat Test höchst signifikant (p < 0,001).

Tab. 5.5: Vierfeldertafel zur Korrelation des Chemotherapieansprechens
Pearson’s Chi-Quadrat Test: p < 0,001
RP = richtig positiv; FP = falsch positiv; RN = richtig negativ; FN = falsch negativ

	Klinisches Ansprechen	
C _i -Vorhersage	sensibel	resistent
sensibel (> 0,5)	41 (77,4%) RP	0 (0%) FN
resistent (≤ 0,5)	0 (0%) FP	12 (22,6%) RN

Wahrscheinlichkeit für progressfreies Überleben

Zur Überprüfung der Annahme, dass der DiSC-Assay in Kombination mit der Auswertmethode Chemosensibilitätsindex C_i bezüglich des progressfreien Überlebens einen prognostischen Wert hat, wurden diese korreliert (Abb.5.4).

Die Patienten, welche durch den C_i Wert als „resistent“ ($C_i \leq 0,5$) eingestuft wurden, hatten ein mittleres progressfreies Überleben von 4 Monaten (Median 0 Monate). Hingegen die Patienten, welche durch den C_i Wert als „sensibel“ ($C_i > 0,5$) beurteilt wurden, wiesen eine durchschnittliche progressfreie Überlebenszeit von 22 Monaten auf (Median 16 Monate). Der Unterschied war nach Log-Rang-Test höchst signifikant ($p < 0,001$).

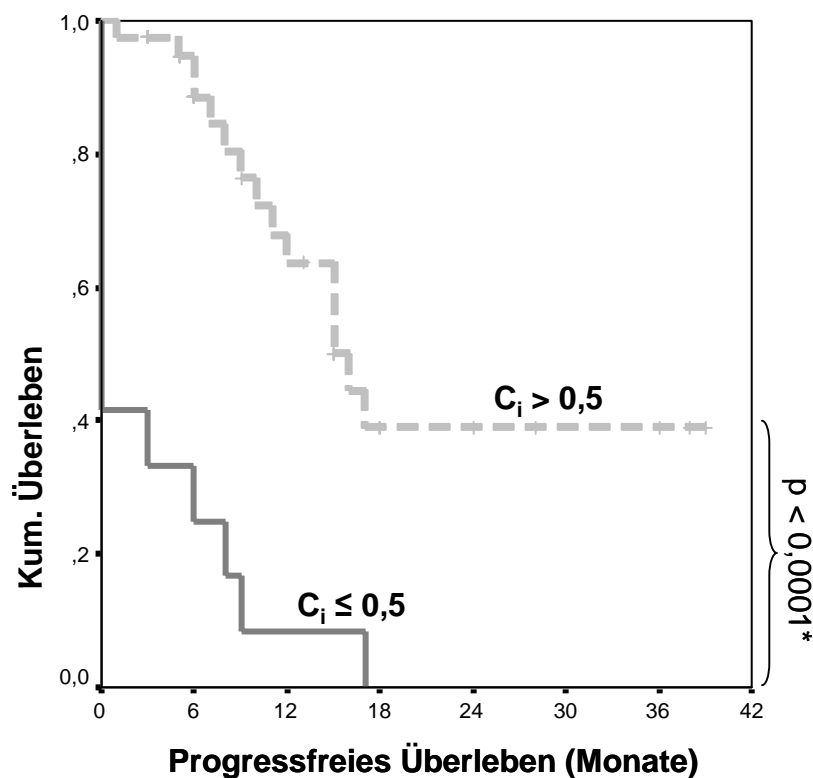


Abb. 5.4: Vergleich der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Vorhersage durch den C_i Wert unterteilt in „resistent“/ $\leq 0,5$ und „sensibel“/ $> 0,5$.

Log-Rang-Test: $p < 0,0001$

Vergleich „resistent“ versus „sensibel“: Bendamustin

Innerhalb der Studie wurden 28 Patienten mit dem Zytostatikum Bendamustin therapiert. 24 von diesen Patienten zeigten ein klinisches Ansprechen auf die Behandlung, vier Patienten hingegen nicht. Der mittlere C_i Wert der klinisch „sensiblen“ Patienten lag bei 0,75 (Median 0,76). Bei den klinisch „resistenten“ Patienten hingegen lag der mittlere C_i Wert nur bei 0,39 (Median 0,40). Mittels Mann-Whitney-U-Test ist der Unterschied signifikant ($p = 0,0018$).

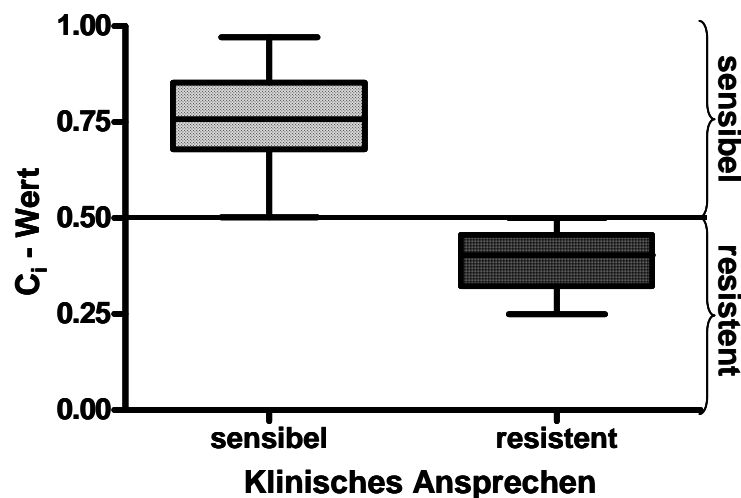


Abb. 5.5: *Klinische Korrelation der C_i Werte von Bendamustin aufgeteilt in klinisches Ansprechen „resistent“/ $\leq 0,5$ und „sensibel“/ $> 0,5$.
Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,0018$*

Vergleich „resistent“ versus „sensibel“: Fludarabin

Mit dem Zytostatikum Fludarabin wurden im Laufe dieser Studie 25 Patienten behandelt. 17 von diesen Patienten zeigten ein klinisches Ansprechen auf die Therapie, acht Patienten hingegen nicht. Der mittlere C_i Wert der klinisch „sensiblen“ Patienten lag bei 0,80 (Median 0,85). Bei den klinisch „resistenten“ Patienten hingegen lag der mittlere C_i Wert nur bei 0,41 (Median 0,41). Mittels Mann-Whitney-U-Test ist der Unterschied höchst signifikant ($p < 0,001$).

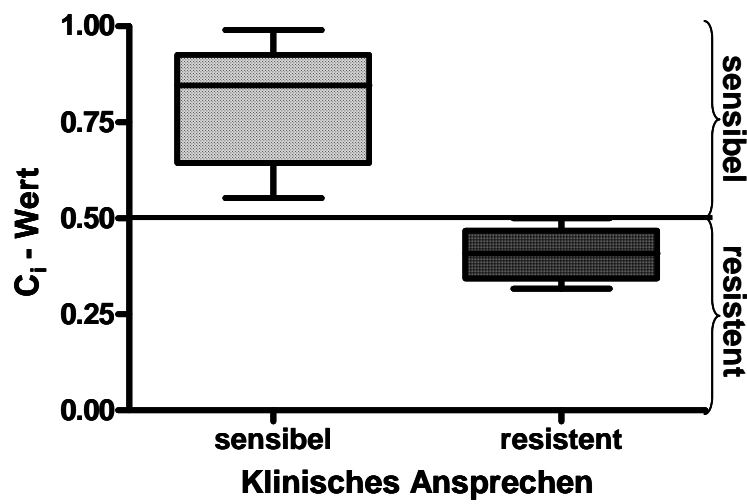


Abb. 5.6: *Klinische Korrelation der C_i Werte von Fludarabin aufgeteilt in klinisches Ansprechen „resistent“/ $\leq 0,5$ und „sensibel“/ $> 0,5$.*
Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$

5.3.2 Klinische Korrelation

Bei den folgenden Auswertungen wurde ein genauerer Vergleich zwischen den *in-vitro* Ergebnissen und dem klinischen Ansprechen durchgeführt. Hierbei wurde eine vierfache Differenzierung nach NCI-Kriterien vorgenommen. Diese bestehen aus kompletter Remission (CR), partieller Remission (PR), stabilem Krankheitsverlauf (NC) und Progression (PD).

Bendamustin

In diese Auswertung wurden 28 Proben eingeschlossen. Fünf Patienten erreichten eine komplette Remission. Der mittlere C_i Wert lag hier bei 0,86 (Median 0,89). Die Mehrzahl von 19 Patienten erreicht eine partielle Remission mit einem C_i Mittelwert von 0,72 (Median 0,73). Drei Patienten hatten einen stabilen Krankheitsverlauf und der mittlere C_i Wert lag bei 0,44 (Median 0,41). Lediglich ein Patient hatte eine Progression unter der Therapie mit Bendamustin. Sein C_i Wert war 0,25.

Beim Vergleich der Mittelwerte mittels Mann-Whitney-U-Test, zeigte sich bei der Korrelation zwischen kompletter und partieller Remission ($p = 0,0330$), sowie beim Vergleich zwischen partieller Remission und stabilem Krankheitsverlauf ($p = 0,007$) eine Signifikanz. Der p-Wert bei der Korrelation zwischen stabilem Krankheitsverlauf und Progression lag bei 0,180.

Unter Anwendung des Jonckheere-Terpstra-Testes zeigte sich über alle Mittelwerte eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$).

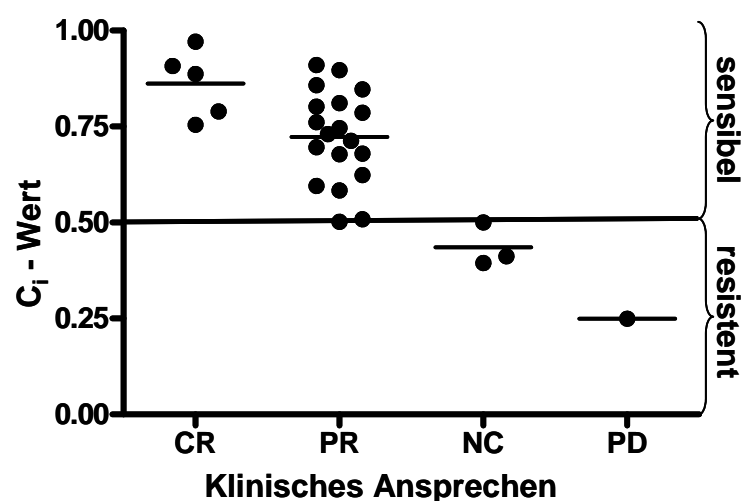


Abb. 5.7: Klinische Korrelation der C_i Werte von Bendamustin ($n = 28$)
Jonckheere-Terpstra-Test: $p < 0,001$

Fludarabin

Bei der klinischen Korrelation von Fludarabin konnten 25 Patienten ausgewertet werden. Vier dieser Patienten konnten eine komplette Remission erreichen, ihr C_i Mittelwert lag bei 0,90 (Median 0,92). Wie bei Bendamustin weist auch bei Fludarabin die Mehrzahl von 13 Patienten eine partielle Remission auf. Der mittlere C_i Wert lag hier bei 0,76 (Median 0,75). Fünf Patienten hatten einen stabilen Krankheitsverlauf, wobei der C_i Mittelwert bei 0,43 (Median 0,46) lag. Eine Progression wiesen drei Patienten auf und deren mittlerer C_i Wert lag bei 0,37 (Median 0,35).

Mittels Mann-Whitney-U-Test war die Korrelation zwischen partieller Remission und stabilem Krankheitsverlauf signifikant ($p = 0,001$). Der p -Wert für die Korrelation zwischen kompletter Remission und partieller Remission war 0,157 und für die Korrelation zwischen stabilem Krankheitsverlauf und Progression 0,250.

Beim Vergleich der gesamten Untersuchungsgruppe mittels Jonckheere-Terpstra-Test zeigte sich eine hohe Signifikanz ($p < 0,001$).

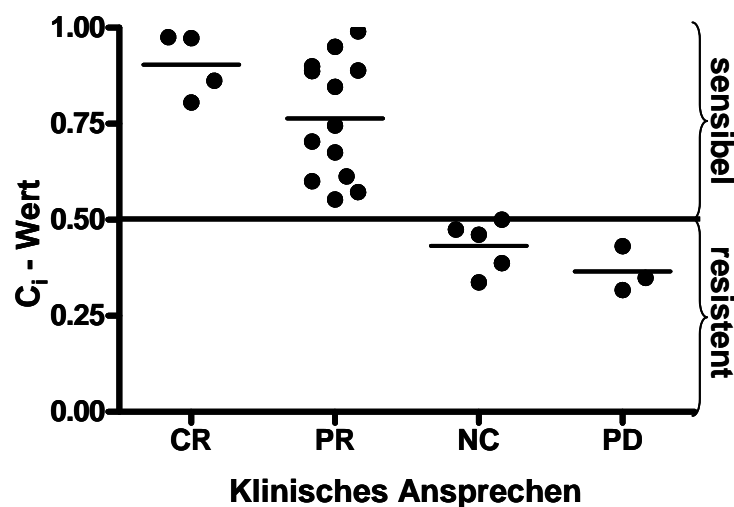


Abb. 5.8: *Klinische Korrelation der C_i Werte von Fludarabin ($n = 25$)*

Jonckheere-Terpstra-Test: $p < 0,001$

5.3.3 Vergleich Fludarabin und Bendamustin

Testverfahren dieser Studie war der DiSC-Assay. Dessen Ergebnisse waren die Daten des prozentualen Tumorzellüberlebens (%TCS). Über die Anwendung der Dosis-Wirkungsfunktion und der Fläche unterhalb dieser Funktion (AUC) wurde das Auswertungsverfahren Chemosensibilitätsindex C_i verwendet. Durch die Eichung der substanzspezifischen Konstante C_k für Bendamustin und Fludarabin, konnten die C_i Werte für diese beiden Zytostatika berechnet werden. Der C_i Wert hat einen Definitionsbereich von 0 bis 1. Der Schnittpunkt zwischen „resistent“ und „sensibel“ liegt bei 0,5. Die als „resistent“ auf das untersuchte Zytostatikum vorhergesagten Patienten haben einen C_i Wert zwischen 0 und 0,5. Der „sensible“ Bereich erstreckt sich zwischen 0,5 und 1. Je höher der C_i Wert liegt, um so „sensibler“ wird der Patient vorhergesagt.

Beim Zytostatikum Bendamustin lag der kleinste C_i Wert bei 0,25 und der höchste bei 0,97 ($n = 28$). Der Mittelwert war bei 0,70 und der Median bei 0,74.

Das Minimum bei Fludarabin lag bei 0,32 und das Maximum bei 0,99 ($n = 25$). Der mittlere C_i Wert wurde als 0,67 berechnet und der Median als 0,66.

Durch Betrachtung der *in-vitro* Chemosensibilitätsprofile, zeigte sich, dass 85,7 % der Bendamustin-Patienten und 68 % der Fludarabin-Patienten als „sensibel“ eingestuft wurden.

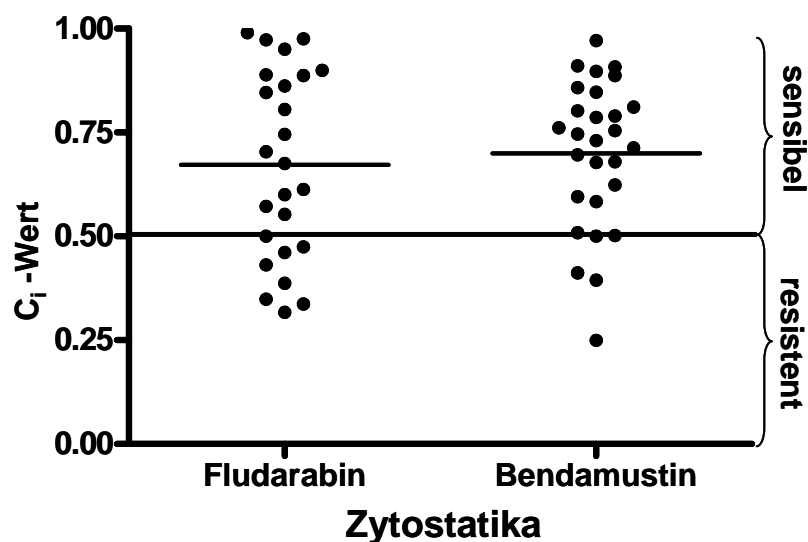


Abb. 5.9: Verteilung der C_i Werte von Bendamustin und Fludarabin mit Angabe des Mittelwertes

Tab. 5.6: *Verteilung des Anteils der „sensiblen“ und „resistenten“ Patienten nach Vorhersage durch den C_i Wert*

C _i -Wert	Proben-Anzahl	Anteil der „sensiblen“ Patienten	Anteil der „resistenten“ Patienten
Fludarabin	25	17 (68%)	8 (32%)
Bendamustin	28	24 (85,7%)	4 (14,3%)

5.4 Sensibilität von Bendamustin

Für diese Untersuchung wurden nicht nur die *in-vitro* Chemosensibilitätsprofile der bisher in dieser Arbeit verwendeten Patienten verwendet, sondern noch zusätzliche 14 Proben. Diese stammen alle von Patienten der Universitätsklinik zu Köln und die Materialabnahme fand zwischen 1999 und 2001 statt.

Kombiniert mit den eigenen 88 Proben, bei denen es Angaben bezüglich der Vorbehandlung gab, wurden in die folgende Untersuchung insgesamt 102 Proben eingeschlossen.

Dabei zeigte sich, dass eine Vorbehandlung mit Fludarabin Auswirkung auf die *in-vitro* Chemosensibilitätsprofile von Bendamustin hat. Bei den 88 Patienten, die vor der Testung noch nicht mit Fludarabin therapiert wurden, zeigte sich ein C_i Mittelwert von 0,69 (Median 0,73). Hingegen bei den Patienten, welche vorher schon mit Fludarabin behandelt wurden lag der mittlere C_i Wert bei 0,30 (Median 0,25). Werden diese Daten mittels Mann-Whitney-U-Test korreliert, so zeigten sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$).

Bei den 88 Patienten ohne Vorbehandlung mit Fludarabin wurden 88 % ($n = 72$) als „sensibel“ auf Bendamustin eingestuft. Hingegen bei den 14 Patienten mit einer Fludarabin-Vorbehandlung wurden nur 29 % ($n = 4$) als „sensibel“ vorhergesagt.

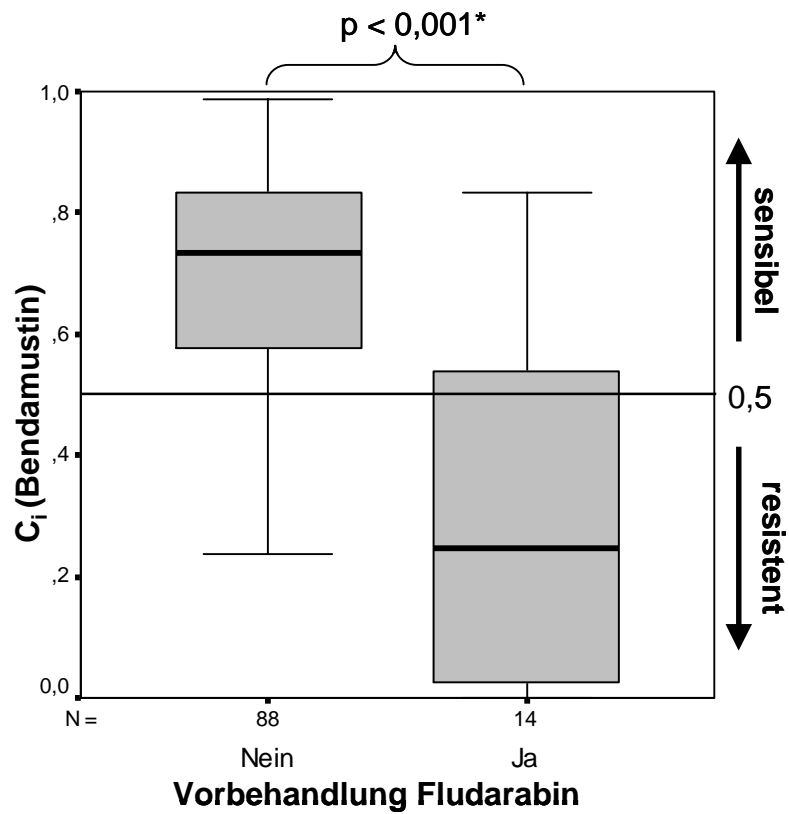


Abb. 5.10: Korrelation der C_i Werte von Bendamustin bezüglich einer Vorbehandlung mit Fludarabin

5.5 Blutdiagnostische Auswertung

Um einen Vergleich der diagnostischen Wertigkeit der C_i-Methode mit in der Routinediagnostik verfügbaren Blutparametern durchführen zu können, wurden diese untersucht. Die Auswahl der Blutwerte wurde auf der Grundlage von früheren Studien zur Prognoseabschätzung festgelegt (Kapitel 2.4.5).

5.5.1 Patientenwerte

Im Rahmen der Blutdiagnostik wurden neben dem Blutbild mit Leukozytenzahl, Lymphozytenwert, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl auch die Serumparameter mit Alkalischer Phosphatase, Laktatdehydrogenase, Thymidinkinase, Harnsäure und β_2 -Mikroglobulin untersucht.

Dem Krankheitsbild der chronischen lymphatischen Leukämie folgend, lagen die Mittelwerte für die Leukozytenzahl (98,8 /nl), sowie für den prozentualen Lymphozytenanteil (83,4 %) deutlich über den jeweiligen Referenzbereichen. Von den 56 auf den Leukozytenwert untersuchten Patienten wiesen durchweg alle Patienten einen Wert oberhalb des Referenzbereiches (4,4 - 11,3 /nl) auf. Allerdings ist eine große Streuung der Werte auffallend (11,7 – 314,5 /nl). Auch bei den insgesamt 60 untersuchten Personen auf den prozentualen Anteil der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl zeigten alle Patienten erhöhte Werte (Referenzbereich 25 -40 %). Eine deutliche Streuung der Werte war aber auch hier festzustellen (43 – 99%).

Hingegen lagen die durchschnittlichen Werte für Hämoglobin mit 12,2 g/dl und für die Thrombozytenzahl mit 121 /nl, ebenfalls kennzeichnend für diese tumoröse Erkrankung, unterhalb der Referenzbereiche (Hämoglobin: 13,5 – 18,0 g/dl; Thrombozyten: 150 -400 /nl). 15 (23 %) der insgesamt 64 Patienten wiesen einen Hämoglobinwert innerhalb des Referenzbereiches auf. Die restlichen 49 Patienten hatten einen erniedrigten Hämoglobinwert (7,9 – 13,4 g/dl). Bei der Thrombozytenzahl lagen die Werte von 16 Patienten (25 %) der 64 untersuchten innerhalb des Referenzbereiches. Werte darunter, hatten alle anderen 48 Patienten (64 – 149 /nl; Tab. 5.7 und Abb. 5.11).

Beim Enzym Alkalische Phosphatase gab es zwar 6 Patienten (10 %) mit erhöhten Werten (131 – 527 U/l), aber im Schnitt lag der Wert mit 96 U/l innerhalb des Referenzbereichs (40 – 129 U/l). Der Mittelwert der Laktatdehydrogenase (LDH)-Werte lag mit 277 U/l oberhalb des Referenzbereiches (135 – 225 U/l), was durch die 32 Patienten (54 %) mit erhöhten Werten (228 – 810 U/l) zu erklären ist. Erwähnenswert ist, dass zwei Patienten erniedrigte LDH-Werte vorwiesen (88 und 124 U/l). Bei der Thymidinkinase lagen die Werte von 35 Patienten

(95 %) oberhalb des Referenzbereiches von 6 U/l und in einem Bereich von 6,3 bis 527 U/l. Lediglich zwei Patienten konnten Werte innerhalb des Referenzbereiches vorweisen (3,1 und 4,0 U/l). Deshalb lag der Mittelwert der Thymidinkinase-Werte mit 46 U/l auch deutlich oberhalb der Referenzspanne. 19 (33 %) der insgesamt 57 untersuchten Patienten lagen bezüglich ihres Harnsäure-Wertes oberhalb des Referenzbereiches von unter 6,6 mg/dl. Die restlichen 38 Patienten wichen nicht ab, so dass auch der Mittelwert aller Patienten bei 6,0 lag. Bei der Auswertung des β_2 -Mikroglobulins zeigten sich mit 42 (93 %) von insgesamt 45 Werten fast alle oberhalb des Referenzbereiches von 0,6 – 2,4 mg/l. Lediglich drei Werte waren innerhalb des Referenzbereiches zu finden. Somit lag der Mittelwert bei 4,3 mg/l (Tab. 5.7 und Abb. 5.12).

Tab. 5.7: *Blutwerte des Patientenkollektivs mit Angabe der Referenzbereiche*

AP = Alkalische Phosphatase; LDH = Laktatdehydrogenase

Blutwert	Proben-Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median	Referenz-Bereich
Leukozyten/nl	56	11,7	314,5	98,8	81,4	4,4 - 11,3
Lymphozyten in %	60	43	99	83,4	88,5	25 - 40
Hämoglobin in g/dl	64	7,9	16,4	12,2	12,5	13,5 -18,0
Thrombozyten/nl	64	24	364	121	105	150 - 400
AP in U/l	59	41	202	96	95	40 - 129
LDH in U/l	59	88	810	277	244	135 -225
Thymidinkinase in U/l	37	3	527	46	21	< 6
Harnsäure in mg/dl	57	2,3	10,3	6,0	5,8	< 6,6
β_2 -Mikroglobulin in mg/l	45	1,9	9,7	4,3	3,7	0,6 – 2,4

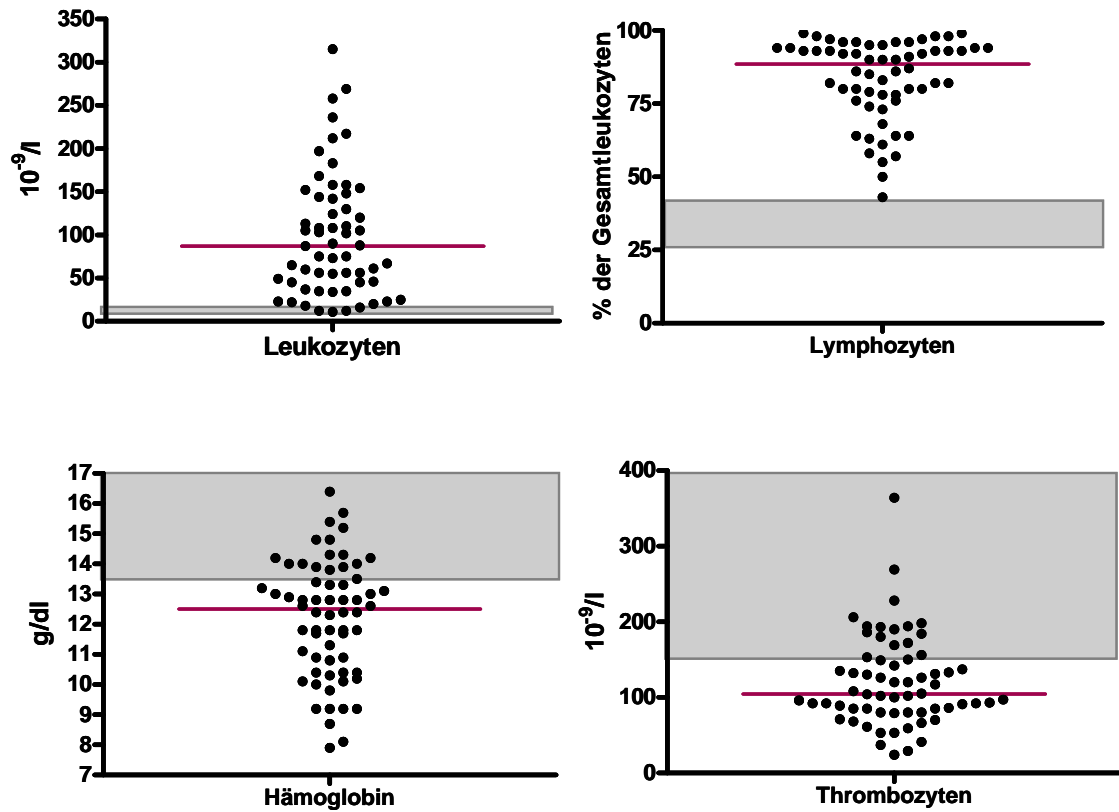


Abb. 5.11: Verteilung der Leukozyten, Lymphozyten, des Hämoglobin und der Thrombozyten beim Patientenkollektiv mit Angabe der Mediane (Linie). Grau unterlegt ist der jeweilige Referenzbereich.

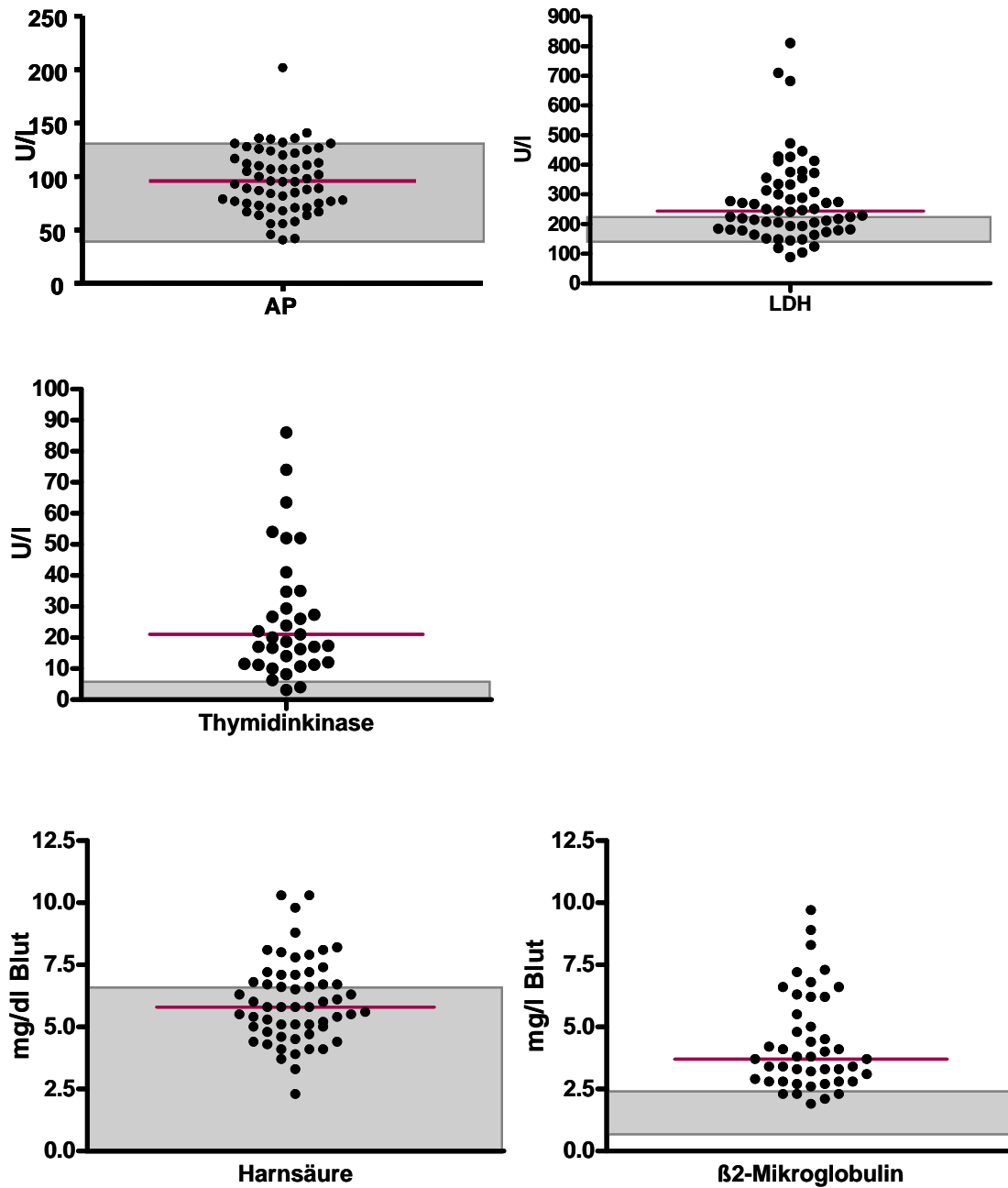


Abb. 5.12: Verteilung der Enzyme Alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase und der Thymidinkinase sowie von Harnsäure und β_2 -Mikroglobulin beim Patientenkollektiv mit Angabe der Mediane (Linie). Grau unterlegt ist der jeweilige Referenzbereich.

5.5.2 Testtauglichkeit

Zur Prüfung, ob mit einem der untersuchten Blutparameter auch die Möglichkeit besteht eine Vorhersage bezüglich des Therapieansprechens durchzuführen, wurde eine *Receiver-Operating-Characteristics* (ROC)-Analyse durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird durch Berechnung von Spezifität und Sensitivität mittels ROC-Kurve die Evaluation eines quantitativ diagnostischen Testes festgestellt. Dazu wird ein so genannter optimaler Schwellenwert (Cut-Off Punkt) ermittelt. Dieser ergibt sich aus der höchsten Übereinstimmung der Sensitivität und der Spezifität.

Die ROC-Analyse wurde sowohl bei der C_i -Methode, als auch bei den untersuchten Blutparametern durchgeführt.

Bei der Therapievorhersage mittels DiSC-Assay mit der C_i -Auswertungsmethode hatte die „*Fläche unter der ROC-Kurve*“ einen Wert von 1,0. Dieser Wert kann nur erreicht werden, wenn der Test keine falsch positiven und keine falsch negativen Ergebnisse vorweisen kann. Sowohl die Sensitivität, wie auch die Spezifität liegen für diese Testmethode somit bei 100 %. Des Weiteren wurde mittels ROC-Analyse der optimale Schwellenwert ermittelt. Er liegt bei der C_i -Methode bei 0,5010 und somit nahe bei dem im Testverfahren verwendeten Cut-Off Punkt von 0,5.

Bei der ROC-Analyse für die untersuchten Blutparameter konnte keine „*Fläche unter der ROC-Kurve (AUROC)*“ den Wert 1,0 aufweisen. Der höchste Wert konnte für die Laktatdehydrogenase mit 0,73 festgestellt werden. Ihr Schwellenwert wurde bei 269 U/l mit einer Sensitivität von 67 % und einer Spezifität von 73 % festgesetzt. Den nächst höchsten Wert für die AUROC zeigte mit 0,68 die Alkalische Phosphatase. Als optimaler Schwellenwert wurde 99 U/l mit einer Sensitivität von 68 % und einer Spezifität von 67 % berechnet. Etwas darunter lag mit 0,66 die AUROC der Thymidinkinase. Deren Schwellenwert mit 66 % Sensitivität und 63 % Spezifität auf 26 U/l geeicht wurde. 0,65 wurde als AUROC für das Hämoglobin berechnet. Bei einem Schwellenwert von 12,0 g/dl könnte hier eine Sensitivität von 63 % und eine Spezifität von 67 % erreicht werden. Einen deutlichen Sprung nach unten mit 0,53 gab es bei der AUROC von den Thrombozyten-Werten. Zudem würde selbst mittels optimalen Schwellenwerts von 99 /n nur jeweils eine Sensitivität und Spezifität von 60 % erreicht werden. Eine ähnliche AUROC wie die von den Thrombozyten-Werten, wurde mit 0,53 auch für das β_2 -Mikroglobulin berechnet. Dieses Eiweiß erhielt einen Schwellenwert von 3,9 mg/l mit einer Sensitivität von 49 % und einer Spezifität von 70 %. Die Leukozyten- und die Lymphozyten-Werte zeigten beide eine AUROC von 0,52. Der optimale Schwellenwert für die Leukozyten lag bei 81,3 /nl mit einer Sensitivität von 52 % und einer Spezifität von 58 %. Mit 84 % wurde der Cut-Off Punkt der Lymphozyten mit einer Sensitivität von 56 % und einer Spezifität von 47 % berechnet. Die kleinste AUROC wurde für die Harnsäure mit 0,5 festge-

legt. Ihr Schwellenwert betrug 5,9 mg/dl mit einer Sensitivität von 48 % und einer Spezifität von 46 % (Tab. 5.9).

Tab. 5.9: *Vergleich der Testverfahren mittels ROC-Analyse bezüglich ihrer Testgenauigkeit*

Testverfahren	Fläche unter der ROC-Kurve (0,5-1,0)	Optimaler Cut-off Punkt	Sensitivität in%	Spezifität in %
C_t-Methode	1,0	0,5010	100	100
Leukozyten	0,5161	81,3 /nl	52	58
Lymphozyten	0,5244	84%	56	47
Hämoglobin	0,6542	12,0 g/dl	63	67
Thrombozyten	0,5326	99 /nl	60	60
Alk. Phosphatase	0,6773	99 U/l	68	67
LDH	0,7326	269 U/l	67	73
Thymidinkinase	0,6573	26 U/l	66	63
Harnsäure	0,5000	5,9 mg/dl	48	46
β₂-Mikroglobulin	0,5271	3,9 mg/l	49	70

5.5.3 Klinische Korrelation

Um die Vorhersagegenauigkeit der Testmethoden bezüglich des klinischen Ansprechens auf eine Chemotherapie zu überprüfen, wurde ein Vergleich mit dem wirklichen klinischen Ansprechen durchgeführt.

Dazu wurden die C_i -Werte und die Blutwerte der Patienten mittels des durch die ROC-Analyse ermittelten Schwellenwertes in „resistente“ bzw. „sensible“ Patienten aufgeteilt. Die Ergebnisse dieser Differenzierung wurden dann mittels Vierfeldertafel mit dem wirklichen klinischen Ansprechen auf die jeweilige Chemotherapie verglichen.

Bei der Korrelation der Vorhersage des Chemotherapieansprechens durch die C_i -Werte zeigte sich, dass alle 53 Patienten, also 100 % richtig vorhergesagt wurden. Keine Vorhersage war falsch negativ und keine Vorhersage war falsch positiv. Nach Pearson's Chi-Quadrat Test ist dies höchst signifikant ($p < 0,001$).

Unter Verwendung der Alkalischen Phosphatase als Einstufungsparameter für das Chemotherapieansprechen zeigte sich eine Vorhersagegenauigkeit von 70 %. Von den insgesamt 59 untersuchten Patienten wurden vier Patienten (7 %) falsch negativ und 14 Patienten (24 %) falsch positiv vorhergesagt. Mittels Pearson's Chi-Quadrat Test ist die Korrelation signifikant ($p = 0,005$).

Auch beim Enzym Laktatdehydrogenase wurde mit einer Vorhersagegenauigkeit von 68 % ein signifikanter Vergleich deutlich (Pearson's Chi-Quadrat Test: $p = 0,007$). Bei den insgesamt 60 korrelierten Ergebnissen wurden vier Patienten (7 %) falsch negativ eingestuft und 15 Patienten (25 %) falsch positiv.

Die Korrelation unter Verwendung des Hämoglobin-Werte zeigte mit einer Vorhersagegenauigkeit von 63 % mittels Pearson's Chi-Quadrat Test eine Signifikanz von $p = 0,047$. Bei diesem Vergleich mit 63 Patienten wurden 5 Patienten (8 %) falsch negativ und 18 Patienten (29 %) falsch positiv vorhergesagt.

Bei Betrachtung der Korrelation unter Gebrauch der Thymidinkinase ergab sich eine Vorhersagegenauigkeit von 65 %. Drei Patienten (8 %) wurden falsch negativ und zehn Patienten (27 %) falsch positiv eingestuft (Gesamtanzahl: 37 Patienten). Mittels Pearson's Chi-Quadrat Test ist der Vergleich nicht signifikant ($p = 0,153$).

Bei der Korrelation unter Anwendung von 63 Thrombozyten-Werten zeigte sich eine Vorhersagegenauigkeit von 60 %. Dieser Vergleich ist nicht signifikant (Pearson's Chi-Quadrat: $p = 0,165$). Sechs Patienten (10 %) wurden falsch negativ und 19 Patienten (30 %) falsch positiv eingestuft.

Unter Verwendung des β_2 -Mikroglobulins als Einstufungsparameter wurde eine Vorhersagegenauigkeit von 47 % gezeigt. Diese Korrelation ist nicht signifikant (Pearson's Chi-Quadrat: $p = 0,297$). Sieben Patienten (16 %) wurden falsch negativ und 17 Patienten (38 %) falsch positiv vorhergesagt.

Bei der Harnsäure als Korrelationsparameter wurde eine Vorhersagegenauigkeit 53 % deutlich. Von insgesamt 57 untersuchten Patienten wurden sechs Patienten (11 %) falsch negativ und 21 Patienten (37 %) falsch positiv eingestuft. Mittels Pearson's Chi-Quadrat Test ist dies nicht signifikant ($p = 0,698$).

Bei der Korrelation unter Anwendung der 60 Lymphozytenwerte zeigte sich eine Vorhersagegenauigkeit von 46 %. Dieser Vergleich ist nach Pearson's Chi-Quadrat Test nicht signifikant ($p = 0,881$). Sieben Patienten (12 %) waren falsch negativ und 25 Patienten (42 %) falsch positiv.

Auch unter Verwendung der 56 Leukozyten-Werte zeigte sich bei der Korrelation mit einer Vorhersagegenauigkeit von 52 % keine Signifikanz ($p = 0,889$). Sechs Patienten (11 %) wurden falsch negativ und 21 Patienten (38 %) falsch positiv vorhergesagt.

Tab. 5.10: *Vergleich unterschiedlicher Testverfahren bezüglich ihrer Vorhersagegenauigkeit des klinischen Ansprechens auf eine Chemotherapie*
*Pearson's Chi-Quadrat Test: * = signifikanter Wert*

Testverfahren	Anteil der richtig vorhergesagten Patienten in %	p-Wert
C_i-Methode	100	< 0,001*
Alk. Phosphatase	70	0,005*
LDH	68	0,007*
Hämoglobin	63	0,047*
Thymidinkinase	65	0,153
Thrombozyten	60	0,165
β₂-Mikroglobulin	47	0,297
Harnsäure	53	0,698
Lymphozyten	46	0,881
Leukozyten	52	0,889

5.6 AUC Daten Auswertung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der DiSC-Assay durchgeführt, um individuelle Chemosensibilitätsprofile zu erstellen. Ergebnisse des DiSC-Assay sind die Daten des prozentualen Tumorzellüberlebens (% TCS). Durch die grafische Darstellung als Dosis-Wirkungskurve konnte für jeden Patienten ein AUC Wert für jedes getestete Zytostatikum ermittelt werden. Der AUC Wert ist ein Maß für die Fläche unterhalb der Dosis-Wirkungskurve. Mittels Anwendung des Chemosensibilitätsindex C_i konnten für die beiden Zytostatika Bendamustin und Fludarabin eine *in-vitro* Vorhersage bezüglich des klinischen Ansprechens durchgeführt werden. Innerhalb dieses Abschnitts soll nun das gesamte Patienten- und Zytostatikakollektiv betrachtet werden.

5.6.1 Gesamtverteilung

Für diese Untersuchung standen 90 DiSC-Assays zur Verfügung. Die Testung erfolgte mit acht verschiedenen Zytostatika, welche alle in der Therapie der chronischen lymphatischen Leukämie angewendet werden. Anhand der Abbildung 5.14 ist zu erkennen, dass die Verteilung der AUC Daten innerhalb eines Zytostatikums annähernd homolog ist. Lediglich Chlorthalidurat bildet hier eine Ausnahme, bei dem eine deutlich Abgrenzung einiger Patientenwerte zu erkennen ist. Weniger deutlich, jedoch trotzdem erkennbar ist auch eine Zweigruppierung bei Prednisolon. Hohe AUC Werte sprechen für ein schlechtes klinisches Ansprechen und niedrige AUC Werte für ein gutes klinisches Ansprechen. Zu beachten ist aber, dass bei dieser Darstellungsform die Zytostatika aufgrund ihrer unterschiedlichen Konzentrationen untereinander nicht vergleichbar sind. Innerhalb eines Zytostatikums ist ein Vergleich der Patienten untereinander jedoch möglich. In der Tabelle 5.10 sind die statistischen Werte der AUC Verteilung der acht verschiedenen Zytostatika zu finden.

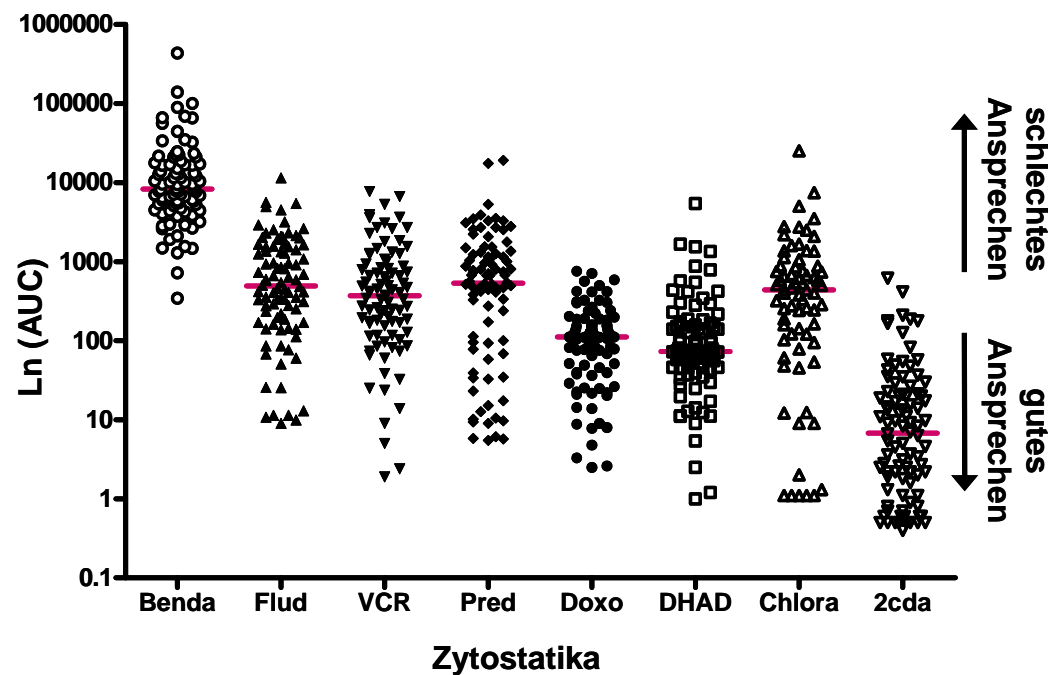


Abb. 5.15: Verteilung der AUC Daten der 90 durchgeführten DiSC-Assays mit Angabe der Mediane

Tab. 5.10: Verteilung der AUC Daten der 90 durchgeführten DiSC-Assays mit Angabe der Mediane

Zytostatika	Proben-Anzahl	Minimum	Maximum	Mittelwert	Median
Bendamustin	90	345,3	433678	20867	8313
Fludarabin	90	0	11501	1092	494,1
Vincristin	90	0	7729	881,2	371,5
Prednisolon	90	0	19179	1299	533,4
Doxorubicin	90	2,5	754,1	147,5	111,1
Mitoxantron	90	0	5434	231,2	73,3
Chlorambucil	71	1,1	25291	1136	437,8
Cladribin	90	0,4	617,8	34,4	6,8

5.6.2 Sensibilität Chlorambucil

Bei der Mehrzahl der untersuchten Patienten wurde vor der *in-vitro* Testung bereits eine zytostatische Behandlung mit Chlorambucil durchgeführt. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob diese zytostatische Vorbehandlung Auswirkungen auf die Sensibilität von Chlorambucil bei den *in-vitro* Testungen hatte.

Zur Auswertung wurden die AUC Daten von insgesamt 67 DiSC-Assays verwendet, da bei diesen sowohl ein Ergebnis des DiSC-Assays vorlag, wie auch die Angabe über eine Vorbehandlung. Bei 16 dieser Assays hatte der Patient keine Vorbehandlung mit Chlorambucil bekommen. Hingegen bei den restlichen 51 Assays hatten die Patienten vorher schon eine Therapie mit Chlorambucil eingenommen. Der mittlere AUC Wert der Patienten ohne Vorbehandlung lag bei 222 (Median 131) und bei den Patienten mit Chlorambucil-Vorbehandlung bei 1471 (Median 580). Mittels Mann-Whitney-U-Test ergab dies einen signifikanten p-Wert ($p < 0,001$). Zudem lag durch die Vorbehandlung von Chlorambucil eine Resistenzsteigerung von Faktor 6,63 vor (Abbildung 5.16).

Zu beachten ist jedoch, dass es bei beiden Gruppen Patienten gab, welche nach Vorhersage durch die *in-vitro* Testung stark sensibel (AUC Wert < 20) reagiert haben. So lag der niedrigste AUC Wert sowohl bei der vorbehandelten Gruppe, wie auch bei der nicht behandelten Gruppe bei AUC = 1,1. Die Maximalwerte waren andererseits stark different (vorbehandelt AUC = 25291; nicht vorbehandelt AUC = 508).

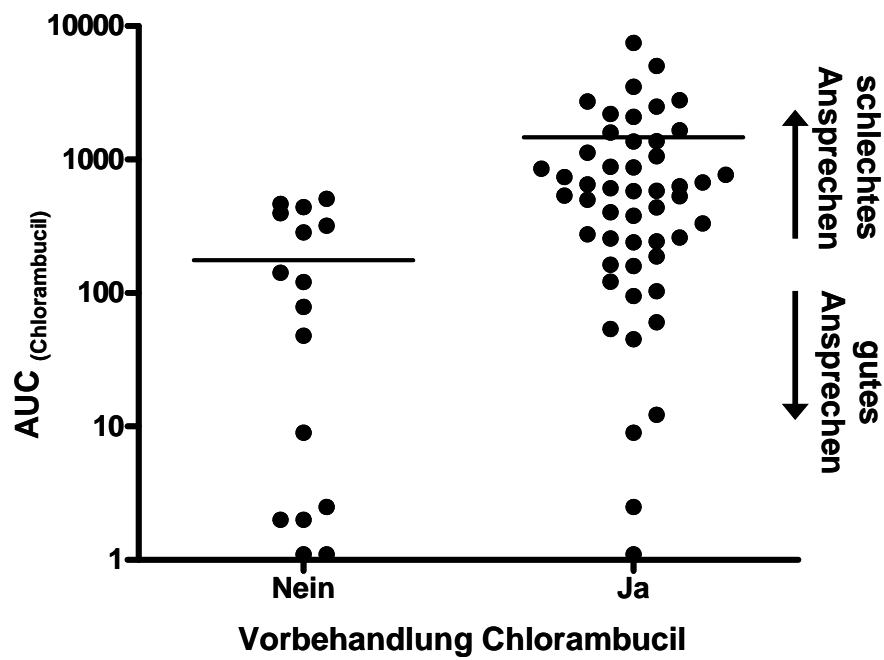


Abb. 5.16: Vergleich der AUC Daten von Chlorambucil bei 67 durchgeführten DiSC-Assays abhängig von einer Vorbehandlung mit Chlorambucil mit Angabe der Mittelwerte

6. Diskussion

Diese Arbeit hatte zum Ziel, erstmalig zu prüfen, ob der Chemosensibilitätsindex C_i bei der Therapievorhersage von Chemotherapien bei Non-Hodgkin Lymphomen anwendbar ist. Hierzu wurde die chronische lymphatische Leukämie des Menschen (B-CLL) aufgrund der einfachen Materialgewinnung und der guten Rekrutierbarkeit als Versuchserkrankung ausgewählt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem erstmals, die für die Vorhersage notwendige Eichung der Konstante C_k für die Zytostatika Fludarabin und Bendamustin vorgenommen.

Die innerhalb dieser Dissertation durchgeführten Versuche waren Teil der Studienbegleitforschung einer zweiarmigen, randomisierten, nationalen, multizentrischen Phase III-Therapiestudie zum Vergleich des Therapieerfolges durch die Monotherapien von Fludarabin bzw. Bendamustin beim Menschen. Insgesamt 25 deutsche hämato-onkologische humanmedizinische Zentren haben hierzu 89 Patienten im Zeitraum von September 2001 bis Juni 2005 rekrutiert. Die Blutproben von allen Patienten wurden an das Labor für molekulare Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik zu Köln geschickt, wo sie im Rahmen dieser Arbeit auf das jeweilige Chemosensibilitätsprofil hin untersucht wurden. Um eine maximale Unabhängigkeit der Beurteilung zu gewährleisten, wurden alle Daten von einem unabhängigen biostatistischen Institut erfasst (WiSP, Wissenschaftlicher Service Pharma GmbH). Zum Abschluss der Beobachtungszeit am 31.05.2006 standen die klinischen Daten von 66 (76,7 %) der 89 untersuchten Patienten zu Verfügung. Bei 13 Patienten wurde jedoch keine reine Monotherapie durchgeführt, so dass diese nicht zur Eichung verwendet werden konnten. Die Chemosensibilitätsindexeichung wurde somit mit insgesamt 53 Patienten durchgeführt.

Die Erfassung der therapeutischen Effektivität in wirksam, bzw. unwirksam erfolgte entsprechend den Vorgaben des amerikanischen nationalen Krebsinstitutes (NCI). Als wirksam, und somit sensibel auf die Chemotherapie wurden die Therapieerfolge gewertet, bei denen eine komplette oder eine partielle Remission (CR, PR) erreicht wurde. Unwirksam, und damit resistent auf die Chemotherapie waren die Therapien, wenn die Erkrankung stabil blieb (SD/NC) oder aber die Erkrankung unter Therapie fortschritt (PD). Von den 53 Patienten konnte bei 41 Patienten (77 %) ein Therapieerfolg erzielt werden, während bei zwölf Patienten (23 %) die Therapie unwirksam war.

Mittels Chemosensitivitätsindex C_i wurde bei allen untersuchten Patienten das klinische Therapieansprechen richtig vorhergesagt. Somit lag bei dem untersuchten Kollektiv sowohl die Sensitivität, Spezifität, als auch die Vorhersagegenauigkeit bei 100%. Der Zusammenhang zwischen der gewählten Vorhersagemethode und dem klinischen Ansprechen war höchst signifikant (Pearson's Chi-Quadrat Test: $p < 0,001$).

Ein weiteres Ziel dieser Dissertation war, neben dem Chemosensitivitätsindex C_i , noch zusätzlich hämatologische Parameter zu untersuchen, welche in Rahmen der Routinediagnostik bei Patienten mit B-CLL geprüft werden. Dabei bestand die Aufgabe, herauszufinden, ob andere Parameter die gleiche prognostische Wertigkeit für die Vorhersage der individuellen Chemosensitivität aufweisen, wie der Chemosensitivitätsindex C_i .

Bei keinem der untersuchten Blutparameter konnte eine annähernd hohe prognostische Wertigkeit wie beim Chemosensitivitätsindex C_i gefunden werden. Zwar konnten die Alkalische Phosphatase, die Laktatdehydrogenase und das Hämoglobin signifikante Korrelationen vorweisen, aber die beste Vorhersagegenauigkeit lag bei diesen Parametern bei 70 %.

Ebenfalls wurde eine mögliche Resistenzsteigerung durch die Anwendung von Zytostatika überprüft. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ansprechrate des Zytostatikums Bendamustin von einer Vorbehandlung mit Fludarabin beeinflusst wird. So wurde ein signifikanter Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht vorbehandelten Patienten deutlich (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,001$). Ferner wurde bei dem Zytostatikum Chlorambucil eine Resistenzsteigerung mit Faktor 6,63 durch eine Vorbehandlung mit Chlorambucil gefunden.

6.1 *In-vivo* / *in-vitro* Korrelation

Um die prognostische Wertigkeit des Chemosensitivitätsindex C_i zu prüfen, wurden dessen Ergebnisse mit dem wirklichen klinischen Ansprechen verglichen. Dabei zeigte sich mittels Pearson's Chi-Quadrat-Test ein höchst signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$). Die Vorhersagegenauigkeit lag bei 100 %. Jeder klinisch resistente Patient wurde durch den C_i Wert als resistent vorhergesagt und jeder klinisch sensible Patient wurde durch den C_i Wert als sensibel eingestuft. Somit scheint die angewendete Methode ein zuverlässiges Verfahren zu sein, um den Ausgang einer Chemotherapie durch eine *in-vitro* Testung vorherzusagen. Zusätzlich war auch die Korrelation, der nach dem C_i Wert in „sensible“ und „resistente“ aufgeteilten Patienten, bezüglich des progressfreien Überlebens höchst signifikant (Log-Rang-Test: $p < 0,001$).

Allerdings ist zu beachten, dass diese Angaben innerhalb des Trainingskollektivs entstanden sind. Zur Überprüfung müssten nun ein weiteres Patientenkollektiv von CLL Patienten getestet werden, bei denen die vorgenommene Eichung kontrolliert wird. Erst dann kann eine endgültige Aussage bezüglich der prognostischen Wertigkeit getroffen werden. Die 100 % Vorhersagegenauigkeit wird dann mit aller größter Wahrscheinlichkeit nicht mehr erreicht wer-

den können, da *in-vitro* nicht der Allgemeinzustand des Patienten, dessen Metabolismus, die Pharmakokinetik des Zytostatikums, sowie dessen mögliche Nebenwirkungen berücksichtigt werden können.

Aber auch schon von den vorliegenden Ergebnissen ist von einer hohen prognostischen Wertigkeit des Testverfahrens auszugehen, sonst hätte es selbst im Trainingskollektiv keine 100 % Übereinstimmung gegeben.

Ähnlich gute Testergebnisse wurden mittels DiSC-Assay und der Auswertungsmethode C_i bereits für die akuten Leukämien gezeigt. So wurde dort eine Vorhersagegenauigkeit von 98,2 % gesehen (Staib, Staltmeier et al., 2005; Schinköthe, 2001). Innerhalb von Studien bei CLL Patienten konnten bisher nur Vorhersagegenauigkeiten von 84% (Bird, Bosanquet et al., 1988) bzw. 94 % (Bosanquet, Copplestone et al., 1999) erreicht werden. Andere Parameter, wie auch das Kapitel Blutdiagnostik dieser Arbeit zeigt sind nicht in der Lage nur annähernd gute Vorhersagen zu geben. Dies verdeutlicht das hohe Potential der vorliegenden Testung als Hilfsmittel für die Therapiewahl bei CLL Patienten.

Auch bei der Betrachtung der einzelnen Zytostatika zeigte der *in-vivo/in-vitro* Vergleich aufgetrennt in sensibles und resistentes Ansprechen mittels Mann-Whitney-U-Test hoch signifikante Ergebnisse. So wurde eine signifikante Korrelation bei Bendamustin ($p = 0,0018$) und bei Fludarabin ($p < 0,0001$) gesehen. Dies zeigt, dass es vor allem bei Fludarabin eine deutliche Trennung zwischen den sensiblen und resistenten Patienten gab. Somit wird auch bei den einzelnen Zytostatika die Exaktheit der *in-vitro* Vorhersage deutlich.

Die Überprüfung dieser Genauigkeit wurde noch erhöht, indem das klinische Ansprechen in vier Bereiche unterteilt wurde. Diese Unterteilung ist auf die NCI-Kriterien zurückzuführen und besteht aus kompletter Remission (CR), partieller Remission (PR), stabilem Krankheitsverlauf (NC) und Progression (PD). Dabei zeigten sich mittels Jonckheere-Terpstra-Test sowohl bei Bendamustin, als auch bei Fludarabin höchst signifikante Ergebnisse ($p < 0,001$). Dies unterstreicht wiederum die Testexaktheit. Bei der Korrelation der einzelnen Remissionskriterien untereinander, unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests, waren bei beiden Substanzen die Unterschiede zwischen PR und NC signifikant (Bendamustin: $p = 0,007$; Fludarabin: $p = 0,001$). Bei der Korrelation von CR und PR hingegen zeigte sich nur bei Bendamustin ein signifikanter Wert ($p = 0,033$), hingegen bei Fludarabin lag der p-Wert bei 0,157. Dies ist zunächst begründbar mit der relativ kleinen Anzahl an CR Patienten ($n = 4$), und zudem an den strengen Voraussetzungen zur Einteilung als CR Patient. So konnten einige PR Patienten klinisch eine CR vorweisen, jedoch in der Histologie des Knochenmarks wurden noch fokale Infiltrationen gefunden, so dass nur eine PR Einstufung durchgeführt wurde. Dies erklärt die Schwierigkeit der Differenzierung. Vergleichbare Probleme treten auch bei der Korrelation von NC und PD auf, so dass auch hier keine signifikante Abstufung möglich

war. Bei Bendamustin lag zudem nur ein Patient mit progressivem Krankheitsverlauf vor und bei Fludarabin waren es nur drei Patienten, was eine mögliche Differenzierung erschwert haben könnte. Auch bei der Anwendung der C_i -Methode bei akuten Leukämien war es nicht möglich eine Differenzierung zwischen CR und PR zu zeigen (Staib, Staltmeier, 2005). In der Literatur ist keine weitere Testung mit einer derartigen Differenzierung zu finden. Eine Testung mit einem größeren Patientenkollektiv sollte zur Klärung, ob eine signifikante Differenzierung möglich ist, durchgeführt werden. Aber wahrscheinlich ist die *in-vitro* Testung hier wohl an eine Grenze gelangt, wo sie nicht mehr die *in-vivo* Situation widerspiegeln kann.

6.1.1 Vergleich Fludarabin und Bendamustin

Werden die Ergebnisse der *in-vitro* Testung unabhängig vom wirklichen klinischen Ansprechen betrachtet, so findet sich für den C_i Wert von Bendamustin ein Mittelwert von $C_i = 0,70$ und für Fludarabin $C_i = 0,67$. Damit liegen beide Werte im „sensiblen Bereich“ ($> 0,5$) nach Vorhersage durch den Chemosensibilitätsindex C_i . Der Unterschied zwischen beiden Mittelwerten ist mit 0,03 nicht besonders groß, weshalb von vergleichbaren Ansprechraten bei Bendamustin und Fludarabin auszugehen ist. Nach den vorliegenden Ergebnissen, müsste Bendamustin im Durchschnitt leicht bessere Ergebnisse erzielen. Durch die wiederum relativ geringe Anzahl an Testpatienten (28 bzw. 25) ist diese Aussage allerdings sehr spekulativ. Durch einen Vergleich mit dem C_i Mittelwert von allen 90 durchgeführten Proben sieht die Tendenz schon ganz anders aus. So lag dort der mittlere C_i Wert von Bendamustin bei 0,64 und von Fludarabin bei 0,75. Auf der Grundlage von diesen Zahlen, würden höhere Ansprechraten von Fludarabin erwartet werden. Deutlich im „sensiblen Bereich“, und somit als Therapieoption verwendbar, liegen nach *in-vitro* Vorhersage beide Zytostatika.

Bei der Betrachtung des Anteils der „sensiblen“ Patienten am Patientenkollektiv, zeigte sich bei Bendamustin mit 85,7 %, als auch bei Fludarabin mit 68,0 % deren Relevanz als Therapieoption bei CLL Patienten. Nach diesen Werten stünde Bendamustin gegenüber Fludarabin sogar noch stärker in Vorteil, als beim Vergleich der Mittelwerte. Durch Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs von 90 Proben wurde erneut eine Umkehr dieses Vorteils sichtbar. Bendamustin hatte dort einen Anteil von „sensiblen“ Patienten von 74,4 % und Fludarabin von 81,1 %. Diese Ansprechraten liegen im Bereich von vergleichbaren Studien (Kath, Blumenstengel et al., 2001; Keating, O’Brien et al., 1998).

Der Chemosensibilitätsindex C_i wurde in einer Studie bereits für die akute myeloische Leukämie angewandt. Dort wurde für das Zytostatikum Daunorubicin ein Anteil an „sensiblen“ Patienten von 90,9 % gefunden (Schinköthe, 2001). Dies zeigt, dass weder Bendamustin noch Fludarabin an diesen Prozentsatz herankommen und somit ein entsprechend wirkendes Zytostatikum zur Behandlung der CLL noch gefunden werden muss.

6.2 Chemosensibilitätsindex C_i

Zur *in-vitro* Testung wurde innerhalb dieser Arbeit der DiSC-Assay in Kombination mit dem Auswertverfahren Chemosensibilitätsindex C_i gewählt.

Seit Beginn der *in-vitro* Testung sind eine Vielzahl von Testsystemen entwickelt worden. Bezüglich der Testung von hämatologischen Neoplasien hat sich der DiSC-Assay als Chemosensibilitätstest der Wahl erwiesen (Bosanquet, 1994). Sein Vorteil liegt eindeutig in der präzisen Auswertbarkeit, welche durch die mikroskopische morphologische Betrachtung der Zellen erreicht wird. So können nicht maligne Zellen eindeutig differenziert und ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ist diese mikroskopische Auswertung allerdings sehr zeitaufwendig. Außerdem ist die Auswertung vom Befunder abhängig, welcher zudem gute zytomorphologische Kenntnisse vorweisen muss (Schinköthe, 2001). Diese Problematik kann entweder durch nur einen Befunder vermieden werden bzw. durch eine genaue Absprache und gemeinsames Training bei mehreren Befundern zumindest vermindert werden.

Beim Auswertungsverfahren wurde der Chemosensibilitätsindex C_i gewählt, weil dieser, im Gegensatz zu den davor verwendeten Verfahren, durch die Anwendung der Fläche unter der Kurve (*Area under the curve*, AUC) als Berechnungsgrundlage die gesamte Dosis-Wirkungskurve berücksichtigt. In den bisherigen Studien bezüglich der *in-vitro* Testung von CLL Patienten wurde jeweils hingegen nur ein Punkt der Dosis-Wirkungskurve als Grenze zwischen Sensibilität und Resistenz definiert (Weisenthal, Marsden et al., 1983; Bird, Bosanquet et al., 1988; Bosanquet und Bell, 1996).

Zudem sprechen die guten Testergebnisse, welche unter Anwendung des Chemosensibilitätsindex C_i bei Patienten mit akuten Leukämien erreicht wurden für diesen. So konnte bei einer Korrelation bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine Vorhersagegenauigkeit von 98,2 % erreicht und eine höchstsignifikante Überlebenswahrscheinlichkeit ($p < 0,001$) gezeigt werden (Staib, Staltmeier et al., 2005). Derartige gute Testergebnisse wurden bisher noch mit keinem anderen Testverfahren gezeigt.

Um den Chemosensibilitätsindex C_i anwenden zu können, muss für jedes zu testende Zytostatikum zunächst eine substratspezifische Konstante C_k ermittelt werden. Diese wird mittels eines Trainingskollektivs geeicht. Die Konstante C_k hebt die Einheiten der Fläche auf und der sich ergebene Index C_i ist frei von Einheiten und kann daher über verschiedene Substanzen hinweg zum Vergleich angewendet werden (Schinköthe, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Eichung der Konstante C_k für die Substrate Bendamustin und Fludarabin. Diese beiden Zytostatika waren die einzigen beiden Substanzen, bei denen genug Patienten mit einer Monotherapie zur Verfügung standen, um die Eichung der Konstante C_k durchzuführen zu können. Dafür sind nämlich für jede Substanz zumindest ein paar klinisch therapierefraktäre Patienten notwendig, da als Schnittpunkt zwischen Sensibili-

tät und Resistenz beim Index C_i der kleinste AUC Wert eines klinischen therapierefraktären Patienten gewählt wird.

Generell ist eine Eichung des Chemosensibilitätsindex C_i auch bei der Anwendung von Polychemotherapien möglich, jedoch sinkt bei deren Anwendung die Zahl der therapierefraktären Patienten, und somit würde das gesamte Probenaufkommen stark ansteigen. Bei beiden Substanzen Bendamustin und Fludarabin war die Verteilung unter der Dosis-Wirkungsfunktion log-normal verteilt. Die therapierefraktären Patienten stellten somit keine eigene Untergruppe dar. Daraus lässt sich schließen, dass aus den *in-vitro* Daten alleine keine Einteilung in sensibel und resistent möglich ist. Um eine solche Trennung vorzunehmen bedarf es daher immer eines Trainingskollektivs, bei dem unter Verwendung der klinischen Daten die Auftrennung vorgenommen werden kann (Schinköthe, 2001).

Unter der Anwendung des Chemosensibilitätsindex C_i zur Berechnung des Anteils an zytostatikasensibler Patienten, wiesen sowohl Bendamustin mit 74,4 %, als auch Fludarabin mit 81,1 % einen relativ hohen Anteil an sensiblen Patienten auf. Was deren Anwendung bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie bestätigt.

6.3 Sensibilität von Bendamustin

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Überprüfung einer möglichen Resistenzerhöhung durch zytostatische Vorbehandlung. Dazu wurde der C_i Wert von Bendamustin von insgesamt 102 Patienten untersucht. Um das Patientenkollektiv zu vergrößern, wurden für diese Untersuchung zusätzliche 14 Patienten zum eigenen Patientenkollektiv hinzugezogen. Diese Patienten wurden alle in der Universitätsklinik zu Köln therapiert und die Testung fand zwischen 1999 und 2001 statt. Von diesen insgesamt 102 Patienten hatten 88 keine Vorbehandlung mit Fludarabin erhalten, hingegen bei den restlichen 14 Patienten wurde vor der *in-vitro* Testung bereits eine Chemotherapie mit Fludarabin durchgeführt. Bei der Korrelation dieser beiden Gruppen präsentierte sich ein höchst signifikanter Unterschied von $p < 0,001$ mittels Mann-Whitney-U-Test. Bei den nicht vorbehandelten Patienten lag der Anteil an „sensiblen“ Patienten mit 82 % deutlich über dem Wert von 29 % bei den mit Fludarabin vortherapierten Personen. Diese Werte verdeutlichen, dass nach einer Therapie mit Fludarabin nicht das Zytostatikum Bendamustin eingesetzt werden sollte. Diese Resistenzsteigerung verwundert, da die Wirkungsweisen dieser beiden Zytostatika differieren. Literaturangaben zufolge gibt es für diese Problematik differente Angaben, weshalb das Studieninteresse diesbezüglich in den letzten Jahren angestiegen ist (Kath, Blumenstengel et al., 2001; Aivado, Schulte et al., 2002; Bergmann, Goebeler et al., 2005). Eine jüngste Studie schlussfolgert, dass die Anwendung von Bendamustin bei Fludarabin-Nativen CLL Patienten, dessen

Ansprechraten maximieren würde (Lissitchkov, Arnaudov et al., 2006). Dies würde mit den vorliegenden Ergebnissen übereinstimmen. Weitere Studien sollten zur Klärung durchgeführt werden.

6.4 Blutdiagnostik

Die statistische Auswertung von Blutparametern diene neben der Erfassung krankheitsbedingter Veränderungen auch der Überprüfung, ob unter Anwendung dieser Blutparameter das individuelle Ansprechen auf eine Chemotherapie vorhergesagt werden kann. Dazu wurde eine Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Analyse durchgeführt. Mit den durch diese ROC-Analyse errechneten optimalen Schwellenwerten erfolgte die klinische Korrelation.

Dem Krankheitsbild der chronische lymphatischen Leukämie entsprechend, waren bei allen Patienten die Gesamtleukozytenzahlen erhöht (Staib und Reiser, 2004). Verursacht wird dies durch die zunehmende Anzahl von Leukämiezellen im peripheren Blut. Die enorme Spannbreite (11,7 – 314,5 Leukozyten/nl) der Gesamtleukozytenzahl bei den verschiedenen Patienten ist auf unterschiedliche Manifestationen der Erkrankung bzw. die ungleich rasch zunehmende Tumormasse zurückzuführen (Emmerich, 2004). Der mittlere Gesamtleukozytenwertwert von 98,8/nl entspricht einer ca. zehnfachen Erhöhung der Gesamtleukozytenzahl einer nicht erkrankten Person. Innerhalb dieser Untersuchung konnte für die absolute Leukozytenzahl keine prognostische Wertigkeit bezüglich des Therapieansprechens nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den meisten Studien (Hallek und Wanders, 1996; Lee, Dixon et al., 1987; Döhner, Fischer et al., 1995). Lediglich für Patienten im Binet-Stadium A scheint es eine prognostische Wertigkeit mittels Leukozytenwert zu geben (Bergmann und Hallek, 2005). Patienten dieses Binet-Stadiums wurden aufgrund des Ausschlusskriteriums innerhalb dieser Studie nicht untersucht.

Bei allen Blutproben war die Voraussetzung zur Diagnose einer CLL mit einer anhaltenden Lymphozytose von $> 5 \cdot 10^9$ Lymphozyten/l im peripherem Blut erfüllt (Schinköthe und Hallek, 2005). Ein durchschnittlicher prozentualer Anteil von 83,4 % der Lymphozyten an der Gesamtleukozytenzahl verdeutlicht den Ursprung der Erkrankung. Der absolute Lymphozytenwert hat nur bei Patienten im Binet-Stadium A eine prognostische Bedeutung. Bei Werten unterhalb von 40.000 – 50.000/ μ l ist die Prognose günstig und darüber ungünstig. In fortgeschrittenen Stadien, in denen sich die Patienten dieser Studie befanden ist der absolute Lymphozytenwert von prognostisch geringer Wichtigkeit, was auch durch die vorliegende Arbeit bestärkt wird (Bergmann und Hallek, 2005).

Durch Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark durch die malignen Zellen, kommt es bei CLL Patienten zu einem Abfall der Hämoglobin- und Thrombozyten-Werte im peripheren Blut. Dieses Phänomen trat auch bei den Patienten in dieser Studie auf, so dass beide Mittelwerte deutlich unter den Referenzbereichen lagen (Hämoglobin: 12,2 g/dl; Thrombozyten: 121 /nl). Diese beiden Blutwerte sind zusammen mit den befallenen Lymphknotenregionen Grundlage für die Stadieneinteilung nach Binet und somit wichtige Prognosefaktoren (Binet, Auquier et al., 1981). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch für das Hämoglobin bezüglich seiner Anwendung zur Vorhersage des Ansprechens auf eine Chemotherapie eine signifikante Korrelation gezeigt werden (Pearson's Chi-Quadrat Test: $p = 0,047$). Allerdings lag die Vorhersagegenauigkeit nur bei 63 %, wodurch eine mögliche Verwendung als Vorhersageparameter minimiert wurde. Für die Thrombozyten-Werte konnte keine Relevanz als Vorhersageparameter nachgewiesen werden. Dies verwundert, zumal der errechnete optimale Schwellenwert mit 99 /nl praktisch identisch ist mit der Differenzierungszahl der Stadien B/C nach Binet (100 /nl) (Binet, Auquier et al., 1981). Erklärbar wäre dieser Unterschied damit, dass mittels Stadieneinteilung nach Binet die Überlebenszeit vorhergesagt wird und bei der vorliegenden Studie das Therapieansprechen untersucht wurde. Allerdings wurde laut einer großen britischen Studie das initiale Ansprechen auf eine Chemotherapie als der beste Vorhersagefaktor für das Überleben gesehen (Catovsky, Fooks et al., 1989).

Bei den Patienten dieser Studie wichen die Werte für die Alkalische Phosphatase nur in sechs Fällen von den Referenzwerten ab. Die prognostische Wertigkeit dieses Enzyms wurde bisher erst in zwei Studien untersucht, bei denen entgegengesetzte Ergebnisse gefunden wurden (Döhner, Fischer et al., 1995; Lee, Dixon et al., 1987). Bei der vorliegenden Untersuchung zeigte sich bezüglich der Vorhersage des Therapieansprechens ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p = 0,005$). Allerdings lag die Vorhersagegenauigkeit nur bei 70 %. Zudem liegt der errechnete Schwellenwert mit 99 U/l mitten im Referenzbereich des Enzyms. Aus diesen Gründen sollte von einer Verwendung als Prognoseparameter abgesehen werden.

Der mittlere Laktatdehydrogenase Wert war bei den untersuchten Patienten zwar mit 277 U/l erhöht, jedoch ist von einer Schlussfolgerung aufgrund der geringen Spezifität bezüglich einer CLL Erkrankung abzusehen. In der Literatur sind fünf Studien über die prognostische Wertigkeit zu finden, jedoch nur in einer wurde diese belegt (Bergmann und Hallek, 2005). Wie bei der Alkalischen Phosphatase kann auch die Laktatdehydrogenase in der vorliegenden Untersuchung eine signifikante Korrelation bezüglich einer Vorhersage des Therapieansprechens vorweisen ($p = 0,007$). Aber auch hier zeigte sich nur eine Vorhersagegenauigkeit von 68 %. Eine Anwendung wäre deshalb zu überdenken.

Für die Serum-Thymidinkinase-Werte verheißt die Literatur anderes. So wurde diesen mehrfach ein unabhängiger prognostischer Wert belegt (Bergmann und Hallek, 2005). Bei CLL

Patienten im Binet-Stadium A wird bei Werten $> 7,0$ U/l eine schnellere Erkrankungsprogression innerhalb eines Jahres vorhergesagt (Hallek, Langenmayer et al., 1999). Die Werte dieses Enzyms waren im vorliegenden Patientenkollektiv fast durchgehend deutlich erhöht. Aber bezüglich des Therapieerfolges konnte keine signifikante Korrelation gezeigt werden, was zudem durch eine Vorhersagegenauigkeit von 65 % bestärkt wurde. Wie bei den Leukozyten-Werten kann diese Differenz durch den unterschiedlichen Patientenpool erklärt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurden nur Patienten im Binet-Stadium B und C und den Literaturstudien nur Patienten im Stadium A verwendet.

Die Werte der Harnsäure waren bei den untersuchten Patienten nur selten erhöht, so dass eine Wichtigkeit bezüglich einer CLL Erkrankung ausgeschlossen werden kann. Dies wurde durch die geringe Vorhersagegenauigkeit von 53 % verdeutlicht. Lediglich in einer Studie wurde eine prognostische Wertigkeit festgestellt (Lee, Dixon, 1987).

In der vorliegenden Arbeit waren fast durchgehend die β_2 -Mikroglobulinwerte erhöht. Allerdings konnte keine signifikante Korrelation bezüglich der Vorhersage des Therapieansprechens gezeigt werden ($p = 0,297$). In einer Studie wurde für Patienten mit β_2 -Mikroglobulin $> 3,5$ mg/l eine ungünstige Prognose gesehen (Hallek und Wanders, 1996). Dies beschränkte sich jedoch zum größten Teil auf Patienten im Binet-Stadium A.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die vorliegenden Blutwerte dem Krankheitsbild der CLL entsprechen. Bezüglich der Vorhersage des Therapieansprechens konnte zwar bei den Enzymen Alkalische Phosphatase (AP) und Laktatdehydrogenase (LDH), sowie beim Hämoglobin eine signifikante Korrelation gezeigt werden, aber die höchste Vorhersagegenauigkeit lag bei diesen Parametern bei 70 %. Deshalb sollte von einer Verwendung abgesehen werden. Zudem ist davon auszugehen, dass das klinische Ansprechen auf eine Chemotherapie eher von zellulären Mechanismen abhängig ist, die über Sensibilität bzw. Resistenz entscheiden, als von Blutparametern, welche das klinische Erscheinungsbild widerspiegeln.

Die Literatur setzt auf die Parameter β_2 -Mikroglobulin, Thymidinkinase und Leukozytenzahl. Die abweichenden Ergebnisse diesbezüglich innerhalb dieser Studie sind durch ein unterschiedliches Patientenkollektiv (Binet-Stadien) zu erklären.

6.5 AUC Daten Auswertung

Da der Chemosensibilitätsindex C_i nur für die Zytostatika Bendamustin und Fludarabin errechnet werden konnte, sollte durch die Auswertung der AUC Daten das gesamte Patienten- und Zytostatikakollektiv betrachtet werden.

Ein Vergleich zwischen den einzelnen Zytostatika ist aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen zwar nicht möglich, aber innerhalb einer Substanz kann differenziert werden. Hohe AUC Werte sprechen für ein gutes Ansprechen und kleine für ein schlechtes. Sind genug Patienten zur Auswertung vorhanden, so kann durch den Vergleich innerhalb der Substanz zumindest eine Tendenz ausgesprochen werden. Lediglich bei den Werten, welche im Mittelfeld liegen, ist eine Einschätzung schwieriger. Eine klare Einteilung in „sensibel“ bzw. „resistent“ kann nicht durchgeführt werden. Allerdings wurde in einer Studie der Median der Flächen als Schwellenwert verwendet, wodurch eine Differenzierung möglich wurde (Neurohr, 2003). Zu bedenken ist aber hierbei, dass dann die Hälfte der Patienten resistent wäre und die andere Hälfte positiv. Eine derartige Aufteilung gibt es aber in der Realität nicht.

6.5.1 Sensibilität Chlorambucil

Bei der Betrachtung der AUC Werte-Verteilung beim Zytostatikum Chlorambucil fiel eine Gruppenzweiteilung auf. Deshalb wurden diese bezüglich einer Chlorambucil-Vorbehandlung untersucht. Im untersuchten Patientenkollektiv wurde so eine Resistenzsteigerung von 6,63 aufgrund einer Vorbehandlung mit Chlorambucil gefunden. Dies würde auf einen Verlust der zytostatischen Wirkung nach wiederholter Behandlung deuten. Dieses Phänomen wurde auch in andere Studien beobachtet (Silber, Begar et al., 1994). Von einer Verwendung von Chlorambucil nach einer Vortherapie mit Purinanaloga wird abgeraten (Rai, Peterson et al., 2000). Erwähnenswert ist jedoch, dass es in beiden Kollektiven Patienten gab, welche hoch sensibel auf Chlorambucil vorhergesagt wurden. Daraus lässt sich schließen, dass nicht alle Patienten eine Resistenz gegenüber Chlorambucil durch dessen Gabe entwickeln, und dass es somit bei diesen Patienten noch wirksam ist. Die Ursache dieser individuellen Resistenzentwicklung wurde bisher noch nicht geklärt.

6.6 Patienten

Das in dieser Studie verwendete Patientenkollektiv hat eine der Lehrbuchmeinung (Hallek und Emmerich, 2006) vergleichbare Geschlechtsverteilung. So sind ca. zwei Drittel der Erkrankten Personen männlich und ein Drittel weiblich. Das Geschlecht ist prognostisch weni-

ger bedeutsam, lediglich bei wenigen Studien scheinen männliche Patienten eine etwas schlechtere Prognose als weibliche Patienten zu haben (Bergmann und Hallek, 2005). Auch die Altersverteilung mit einer Spannweite von 39 bis 83 Jahren und einem Median von 66 Jahren entspricht der typischen Verteilung bei CLL Patienten. Das Alter scheint ebenfalls kein unabhängiger prognostischer Faktor bei der CLL zu sein (Molica, Brugiatelli et al., 1994).

Die Verteilung der Binet-Stadien entspricht mit Binet B 43,8 % Anteil und Binet C 56,3 % Anteil nicht der gängigen Verteilung, was aber auf das Studienausschlusskriterium von Binet A Patienten begründet ist. Binet A Patienten werden nur selten mit einer Chemotherapie behandelt, und waren somit in diese Studie nicht integrierbar.

Innerhalb des Patientenkollektivs wurde die Mehrheit von 89,4 % mit Chlorambucil vorbehandelt. Diese Alkylans wird vor allem bei älteren Patienten als erste Therapiemöglichkeit gewählt. Aufgrund seiner einfachen oralen Applikationsform ist es die am häufigsten eingesetzte Substanz in der CLL Therapie. Die Patienten, welche zusätzlich Prednisolon verabreicht bekommen haben (25,8 %) stammen durchgehend aus den ersten Jahren des Rekrutierungszeitraumes. Heutzutage wird allerdings von dieser Kombination abgeraten, da es keinen therapeutischen Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Chlorambucil bringt (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zu 80,3 % die Patienten mit Fludarabin bzw. Bendamustin therapiert. Diese Patienten stammen alle aus einer Studie, bei der diese beiden Zytostatika miteinander verglichen werden sollten. Die restlichen Patienten wurden entweder mit Chlorambucil behandelt bzw. mit einer Kombinationschemotherapie, meistens unter der Verwendung von Antikörpern. Die abweichenden Chlorambucilbehandlungen sind auf den Wunsch der Patienten zurückzuführen. Hingegen die Anwendung von Kombinationschemotherapien bei der Therapie von CLL Patienten ist auf der Grundlage von neuen Therapieoptionen im letzten halben Jahr des Rekrutierungszeitraumes zum Einsatz gekommen.

Zu Studienbeginn galt Fludarabin als die Standardtherapie, vor allem bei der Rezidivbehandlung von CLL Patienten. Dies beruhte auf den verhältnismäßig hohen Ansprechraten von bis zu 67 % bei vorbehandelten Patienten (Eichhorst, Bergmann et al., 2005), der relativ hohen CR-Rate und der verlängerten Zeit bis zur Progression. Eine längere Gabe dieses Purinanalogs ist allerdings, gerade bei intensiver Vorbehandlung, hohem Alter sowie eingeschränkter Myelopoese mit einem erheblichen Risiko schwerer Komplikationen – insbesondere infektiöser Natur – verbunden. Aus diesem Grund sollte Bendamustin, unter dem Aspekt einer vergleichbaren therapeutischen Effektivität bei insgesamt besserer Verträglichkeit mit Fludarabin verglichen werden (Niederle, 2001). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde Bendamustin kaum in Hinblick auf die CLL Therapie untersucht, so dass erst im Jahr 2005 die optimale Dosierung ermittelt werden konnte (Bergmann, Goebeler et al., 2005).

Jüngere Studien weisen darauf hin, dass Kombinationstherapien bessere Ansprechraten erzielen können als die Monotherapien mit Fludarabin bzw. Bendamustin. So wurde in einer Phase II Studie in der Kombination von Fludarabin und dem Antikörper Alemtuzumab eine Ansprechrate von 83% gesehen (Elter, Borchmann et al., 2005). Eine weitere Studie fand für die Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid eine Ansprechrate von 94 % (Eichhorst, Busch et al., 2006).

Bei diesen neuen Studien sollte allerdings beachtet werden, dass diese von dem Routineeinsatz noch weit entfernt sind, und wenn nur bei jüngeren CLL Patienten angewendet werden sollte. Für rein palliative Zwecke bei älteren Patienten wäre die Behandlung zu aggressiv.

Beim klinischen Ansprechen entspricht ein Patientenanteil von ca. 60 % mit partieller Remission und ein Prozentsatz von ca. 18 % mit kompletter Remission dem, was im Vergleich mit anderen Studien mit einer Monotherapie mit Fludarabin bzw. Bendamustin erreicht werden kann (Eichhorst, Bergmann et al., 2005).

6.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das angewendete *in-vitro* Verfahren eine gute Methode ist, um das individuelle Ansprechen auf eine Chemotherapie vorherzusagen. Somit kann in der Zukunft eine Therapiewahl zur Behandlung eines CLL Patienten auf einen *in-vitro* Test beruhen. Die Wahrscheinlichkeit einer nicht anschlagenden Chemotherapie kann minimiert werden.

Sicherlich müsste zur Überprüfung der vorliegenden Ergebnisse ein weiteres Patientenkollektiv getestet werden. Deren Einstufung sollte dann auf der vorliegenden Eichung beruhen. Ein weiterer wichtiger Schritt wird sein, aufbauend auf der vorliegenden Arbeit weitere Entitäten der Non-Hodgkin Lymphome zu testen und zu klären, wie eine Übertragbarkeit auf andere Spezies, wie zum Beispiel die Malignen Lymphome des Hundes realisiert werden können. Im Hinblick auf eine Testweiterentwicklung sollte an eine möglich Automatisierung gedacht werden, um einen Routineeinsatz möglich zu machen. Zudem sollte eine möglich Testung mit Antikörpern geprüft werden, da dieser immer häufiger zur Therapie der CLL verwendet werden.

6.8 Übertragbarkeit und Anwendung beim Hund

Sicherlich können die Ergebnisse, welche beim Menschen gefunden wurden, nicht direkt auf den Hund übertragen werden. Jedoch weisen beide Spezies eine ähnliche Physiologie auf, teilen einen großen Anteil an genetischer Homogenität und sind der gleichen Umwelt ausgesetzt (Sutter, Eberle et al., 2004). Das volle Spektrum von hämatologischen Tumoren, welche beim Menschen vorkommen, wird auch beim Hund diagnostiziert. Es gibt sogar eine Übereinstimmung im klinischen Erscheinungsbild, der Histologie und der Biologie der Erkrankungen (Fournel-Fleury, Magnol et al., 1997; Fernandes, Mondiano et al., 2002).

Unterschiedlich ist jedoch der Anteil der B-Zell und T-Zell Neoplasien. Bei den Menschen ist die B-Zell Neoplasie in der westlichen Welt deutlich häufiger, als eine T-Zell Erkrankung. Dies ist bei Hunden umgekehrt. Allerdings, wenn andere Bevölkerungsgruppen (Asiaten, nicht-Caucasier in Amerika) betrachtet werden, so liegt auch hier die T-Zell Neoplasie im Vorteil (Modiano, Breen et al., 2005).

Auch das Erscheinungsbild der chronischen lymphatischen Leukämie ist bei beiden Genre vergleichbar. Entscheidend ist aber, im Bezug auf eine mögliche Anwendung der *in-vitro* Chemosensibilitätstestung beim Hund, dass die gleichen Zytostatika zur Therapie verwendet werden und auch ähnliche Wirkungen vorweisen. Gewiss sind die Therapiemöglichkeiten beim Menschen größer, aber dies ist nicht aufgrund mangelnder Funktionalität beim Hund, sondern viel mehr aufgrund von erhöhten Forschungs- und Anwendungsmöglichkeiten beim Menschen bedingt. Des Weiteren werden die Dosierungen beim Hund deutlich geringer gewählt, da die Hauptintention eine Palliation ist und nicht eine Kuration. Vergleichbar ist dies mit der Intention bei älteren Personen, welche bei der CLL auch weitestgehend palliativ behandelt werden.

Als Probenmaterial dient bei Leukämiepatienten eine Blutprobe, wahlweise kann auch Knochenmark verwendet werden. Ebenfalls ist die Verwendung von Biopaten z.B. bei Lymphomen möglich. Durch eine maschinelle Trennung der einzelnen Tumorzellen, können diese dann zur *in-vitro* Testung verwendet werden. Bei kleinen Hunderassen (< 10 kg) könnte die Materialentnahme besonders im Hinblick auf eine Blut- bzw. Knochenmarkentnahme ein limitierender Faktor sein, da der untere Grenzwert der benötigten Blutmenge bei drei Millilitern liegt, um genügend Tumorzellen gewinnen zu können. Dies schränkt auch eine mögliche Anwendung bei der Katze ein.

Der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC)-Assay ist in jedem hämatologischen Labor durchführbar, da es keiner Anschaffung aufwendiger Geräte bzw. Materialien bedarf.

Um die *in-vitro* Testung beim Tier zu ermöglichen, müsste sicherlich auch erst ein Trainingskollektiv getestet werden, um die Funktionalität zu überprüfen. Eindeutige Hinweise, die gegen eine Anwendbarkeit beim Tier sprechen, gibt es bisher nicht.

7. Zusammenfassung

Individuelle Vorhersage des Chemotherapieansprechens mittels *in-vitro* Chemosensibilitätstestung bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie

Hämatopoetische Neoplasien gehören sowohl beim Hund als auch beim Menschen zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Bei der Therapie dieser Erkrankungen hat die zytostatische Chemotherapie nach wie vor die größte Bedeutung. Allerdings zeigt sich das Problem, dass selbst bei identischer Diagnose das Ansprechen auf eine Chemotherapie sehr unterschiedlich ausfallen kann. Die Ursache dafür liegt bei einem individuellen Resistenzverhalten eines jeden Patienten. Aus diesem Grund wurde die *in-vitro* Chemosensibilitätstestung entwickelt, um für jeden Patienten ein eigenes Chemosensibilitätsprofil erstellen zu können. Dadurch ist eine individuell abgestimmte Therapie möglich und unwirksame Behandlungen mit samt ihren Nebenwirkungen, Aufwand und Kosten können vermieden werden. Innerhalb der Entwicklungsgeschichte der *in-vitro* Chemosensibilitätstests hat sich gezeigt, dass der Differential Staining Cytotoxicity (DiSC) Assay mit Gebrauch der Auswertungsmethode Chemosensibilitätsindex C_i bei Patienten mit akuten Leukämien die Methode der Wahl ist, um das Therapieansprechen vorherzusagen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte erstmals geklärt werden, ob dieses Testverfahren auch bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen anwendbar ist. Dazu wurde Blut von Humanpatienten mit chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell Typ (B-CLL) untersucht.

Bei insgesamt 53 Patienten konnte eine klinische Korrelation zwischen *in-vitro* Vorhersage und dem Ansprechen der Therapie mit den Zytostatika Fludarabin bzw. Bendamustin durchgeführt werden. 41 der Patienten (77 %) wurden erfolgreich therapiert, bei zwölf der Patienten (23 %) hingegen versagte die Therapie. Mittels Chemosensibilitätsindex C_i wurde für alle beprobten Patienten das klinische Therapieansprechen richtig vorhergesagt. Sowohl Sensitivität, Spezifität, als auch die Vorhersagegenauigkeit lagen somit beim untersuchten Kollektiv bei 100 %. Der Zusammenhang zwischen der gewählten Vorhersagemethode und dem klinischen Ansprechen war höchst signifikant ($p < 0,001$). Diese signifikante Korrelation der *in-vitro* und *in-vivo* Daten eröffnet die Möglichkeit zukünftig nach dem Ergebnis der *in-vitro* Testung die Auswahl der jeweils wirksamsten Therapie zu stratifizieren.

Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass die C_i -Methode im Vergleich mit untersuchten Blutparametern die stärkste prognostische Wertigkeit hat bezüglich der Vorhersage des klinischen Ansprechens ($p < 0,001$). Dies bestärkt, dass der Chemosensibilitätsindex C_i auch bei lymphatischen Leukämien die Methode zur Wahl zur Vorhersage des Therapieerfolges ist.

8. Summary

Individual response prediction to chemotherapy by using *in-vitro* chemosensitivity testing for patients with chronic lymphocytic leukaemia

Haematopoietic neoplasia is one of the most frequent tumor diseases in dogs and humans. In terms of therapy cytotoxic chemotherapy is still the most important method. What can be seen as problematic for this method is that even with an identical diagnosis, the response of a patient to a chemotherapy can be very different. This is a result of the individual resistance of each patient. For this reason the *in-vitro* chemosensitivity testing has been developed in order to enable the creation of an individual chemosensitivity profile for each patient. Thus, an individual synchronised therapy is possible and ineffective treatments and their side effects, efforts and costs can be avoided. The history of development of *in-vitro* chemosensitivity testing has shown, that the differential staining cytotoxicity (DiSC) assay in combination with the evaluation methodology chemosensitivity index C_i is the method of choice to predict treatment results for patients with acute myeloid leukaemia.

Within this study it will be clarified for the first time, whether this test method can also be used for patients with non-Hodgkin lymphoma. Therefore peripheral blood samples from human patients with chronic lymphocytic leukaemia of the B-cell type (B-CLL) have been analysed.

For 53 patients, a correlation between *in-vitro* prediction and clinical outcome of the therapy with the cytotoxic drugs fludarabine and bendamustine could be stated. For 41 patients (77 %) the therapy was effective, however for twelve patients (23 %) the treatment failed. By using the chemosensitivity index C_i , the clinical outcome was correctly predicted in all cases. Sensitivity, specificity and overall predictive accuracy were all 100 % in the test collective. The correlation between the chosen methodology and the clinical outcome was highly significant ($p < 0,001$). This significant correlation between *in-vitro* and *in-vivo* data enables to stratify the option of the most effective treatment in the future.

In addition to that, it could be demonstrated, that in comparison to other analysed heamo-parameters the C_i methodology has the strongest predictive validity concerning the prediction of the clinical outcome ($p < 0,001$). This confirms that the chemosensitivity index C_i is the method of choice to predict treatment outcome also for patients with chronic lymphocytic leukaemia.

9. Literaturverzeichnis

Aivado, M., Schulte, K., Henze, L., Burger, J., Finke, J. und Haas, R. Bendamustine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: results and future perspectives. *Seminars in Oncology*, 29: 19-22, **2002**.

Aktories, K. und Unger, C. Mittel zur Behandlung von Tumoren - Tumorchemotherapie. In: W. Forth, D. Henschler, und W. Rummel (Hrsg.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Vol. 9: 921-959. München: Urban & Fischer Verlag, **2005**.

Aleskog, A., Larsson, R., Höglund, M., Kristensen, J., Nygren, P., und Lindhagen, E. In vitro drug resistance in B cell chronic lymphocytic leukemia: a comparison with akute myelocytic and akute lymphocytic leukemia. *Anti-Cancer Drugs*, 16: 277-283, **2005**.

Bellamy, W. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in-vitro assays. *Drugs*, 44: 690-708, **1992**.

Bergmann, M., Goebeler, M., Herold, M., Emmerich, B., Wilhelm, M., Ruelfs, C., Boening, L., und Hallek, M. Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group. *Haematologica*, 90: 1357-1364, **2005**.

Bergmann, M. und Hallek, M. Prognoseabschätzung. In: M. Hallek and B. Emmerich (Hrsg.), *Chronische Lymphatische Leukämie*, Vol. 2, 62-78. Bremen: UNI-MED Verlag, **2005**.

Bernardi, G. Longevity and mortality in the Irish Wolfhound in the United States: 1966-1986. *Harp and Hound*, Vol. 1, 78-84, **1988**.

Binet, J., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasquen, J., Vaugier, G., Potron, G., Colona, P., Oberling, F., Thomas, M., Tchernia, G., Jacquillat, C., Boivin, P., Lesty, C., Duault, M.T., Monconduit, M., Belabbes, S. und Gremy, F. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, Vol. 48: 198-204, **1981**.

Bird, M. C., Bosanquet, A.G., Forskitt, S., und Gilby, E. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of haematological malignancies. *Leukemia Research*, 10: 445-449, **1986**.

Bird, M. C., Bosanquet, A. G., Forskitt, S., und Gilby, E. D. Long-term comparison of results of a drug sensitivity assay in vitro with patients response in lymphatic neoplasmas. *Cancer*, 61: 1104-1109, **1988**.

Blumenthal, R. An Overview of Chemosensitivity Testing. In: R. D. Blumenthal (Hrsg.), *Methods in Molecular Medicine: Chemosensitivity*: Vol.1: In vitro Assays, Vol. 110: 3-18. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., **2005**.

Bonnett, B. N., Egenvall, A., Olson, P. und Hedhammar, A. Mortality in insured Swedish dogs: rates and diagnostic category of death in various breeds. *The Veterinary Record*, 141: 40-44, **1997**

Bonnett, B. N., Egenvall, A., Hedhammar, A., und Olson, P. Mortality in over 350,000 Insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, Gender-, Age- and Cause-specific Rates. *Acta veterinaria scandinavia*, 46: 105-120, **2005**.

Bosanquet, A., Sturm, I., Wieder, T., Essmann, F., Bosanquet, M., Head, D., Dorken, B., und Daniel, P. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabin, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 16: 1035-1044, **2002**.

Bosanquet, A. G. Correlations between therapeutic response of leukemias and in-vitro drug-sensitivity assay. *Lancet*, 337: 711-714, **1991**.

Bosanquet, A. G. Short-term in vitro drug sensitivity tests for cancer chemotherapy. A summary of correlations of test result with both patient response and survival. *Forum: Trends in Experimental and Clinical Medicine*, 4:179-195, **1994**.

Bosanquet, A. G. und Bell, P. B. Enhanced ex vivo drug sensitivity testing of chronic lymphocytic leukemia using refined DiSC assay methodology. *Leukemia Research*, 20: 143-153, **1996**.

Bosanquet, A. G., Copplestone, J. A., Johnson, S., Smith, A., Povey, S., Orchard, J., und Oscier, D. Response to cladribine in previously treated patients with

chronic lymphocytic leukaemia identified by ex vivo assesement of drug sensitivity by DiSC assay. *Britisch Journal of Haematology*, 106: 474-476, **1999**.

Bredal, W. P., Moe, L. und Glattre, E. Demographic characteristics of Bernese mountain dogs in Norway. *The Kenya Veterinarian*, 18: 283, **1994**

Bronzon, R. T., Variation in age at death of dogs of different sexes and breeds. *American Journal of Veterinary Research*, 43: 2057-2059, **1982**

Catovsky, D., Fooks, J. und Richard, S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia – the importance of age, sex, and response to treatment and survival. A report from the MRC CLL 1 trial. *The British Journal of Haematology*, 72: 141-149, **1989**

Cheson, B.D., Bennet, J.M., Grever, M., Kay, N., Keating, M.J., O’Brien, S. und Rai, K.R. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87: 4990-4997, **1996**.

Chiorazzi, N., Kanti, M., Rai, R., und Ferrarini, M. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 352: 804-815, **2005**.

Cole, S. P. Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 17: 259, **1986**.

Deutsches-Krebsforschungszentrum, Krebsatlas für das Jahr 2003. Erhalten am 21.02.2006 von www.dkfz-heidelberg.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame.htm, **2003** (letzte Änderung 26.03.2005).

Dobson, J. M., Milstein, S.S., Rogers, K., und Wood, J. L. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *The Journal of Small Animal Practice*, 43: 240-246, **2002**

Döhner, H., Fischer, K., Bentz, M., Hansen, K., Brenner, A., Labot, G., Diehl, D., Schlenk, R., Coy, J., Stilgenbauer, S., Volkmann, M., Galle, P.R., Poustka, A., Hunstein, W. und Lichter, P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 85: 1580-1589, **1995**.

Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Krober, A., Bullinger, L., Döhner, K., Bentz, M. und Lichter, P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 303: 1910-1916, **2000**.

Dreger, P., Ritgen, M., Schetelig, J., und Schmitz, N. Die Rolle der Stammzelltransplantation. In: M. Hallek and B. Emmerich (Hrsg.), *Chronische Lymphatische Leukämie*, Vol. 2: 104-116. Bremen: UNI-MED Verlag AG, **2005**.

Efferth, T. und Osieka, R. Substanzklassen und Wirkmechanismen. In: Schmoll, Höffken, and Possinger (Hrsg.), *Kompendium Internistische Onkologie* Teil 1, Vol. 4: 1442-1443. Heidelberg: Springer-Verlag, **2006**.

Egenvall, A., Bonnett, B. N., Hedhammar, A. und Olson, P. Mortality in over 350,000 Insured Swedish Dogs from 1995-2000: II. Breed-Specific Age and Survival Patterns and Relative Risk for Causes of Death. *Acta veterinaria scandinavia*, 46: 121-136, **2005**.

Eichhorst, B., Bergmann, M., Hallek, M., Herold, M., und Hopfinger, G. Die konventionelle Therapie. In: M. Hallek and B. Emmerich (Hrsg.), *Chronische Lymphatische Leukämie*, Vol. 2: 80-102. Bremen: UNI-MED Verlag, **2005**.

Eichhorst, B., Busch, R., Hopfinger, G., Pasold, R., Hensel, M., Steinbrecher, C., Siehl, S., Jager, U., Bergmann, M., Stilgenbauer, S., Schwieghofer, C., Wendtner, C.M., Döhner, H., Brittinger, G., Emmerich, B., Hallek, M. und German CLL Study Group Fludarabin plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107: 885-891, **2006**.

Elter, T., Borchmann, P., Schulz, H., Reiser, M., Trelle, S., Schnell, R., Jensen, M., Staib, P., Schinköthe, T., Stützer, H., Rech, J., Gramatzki, M., Aulitzky, W., Hasan, I., Josting, A., Hallek, M. und Engert, A. Fludarabine in Combination With Alemtuzumab Is Effective and Feasible in Patients With Relapsed or Refractory B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of a Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 23: 1-8, **2005**.

Emmerich, B. Chronische Lymphatische Leukämie. In: Hiddemann, W., Huber, H., Bartram, C. (Hrsg.), *Die Onkologie*, Teil 2: 1976-2000. Heidelberg: Springer-Verlag, **2004**

Fernandes, P., Mondiano, J., Wojcieszyn, J., Thomas, J.S., Benson, P.A., Smith, R., Avery, A.C., Burnett, R.c., Boone, L.I., Johnson, M.C. und Pierce, K.R. Use of the Cell-Dyn 3500 to predict leukemic cell lineage in peripheral blood of dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 31: 167-182, **2002**.

Fournel-Fleury, C., Magnol, J., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, B.A. und Felman, P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117: 35 - 59, **1997**.

Gatti, L. und Zunino, F. Overview of Tumor Cell Chemoresistance Mechanisms. In: R. Blumenthal (Hrsg.), *Methods in Molecular Medicine: Chemosensitivity* Vol: 2 In Vivo Models, Imaging, and Molecular Regulators, Vol. 111: 127-148. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc., **2005**.

Goldin, L. und Landgren, O. Familial Aggregation and Heterogeneity of Non-Hodgkin Lymphoma in Population-Based Samples. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, Vol.14: 2402-2406, **2005**.

Hallek, M., Vorlesungen SS 2006 der Inneren Medizin I der Universität zu Köln: *Chronische lymphatische Leukämie*, (Prof. Dr. M. Hallek). Erhalten am 15.06.06 von www.medizin.uni-koeln.de/kliniken/innere1/lehre/pdf/cll_Hallek06.pdf, **2006**.

Hallek, M., Bergmann, M. und Emmerich, B. Chronische Lymphatische Leukämie. *Deutsches Ärzteblatt*, Heft 19: 1294-1301, **2002**.

Hallek, M. und Emmerich, B. Chronische lymphatische Leukämie / lymphoplasmazytoides Lymphom. In: Schmoll, Höffken, and Possinger (Hrsg.), *Kompendium Internistische Onkologie* Teil 2, Vol. 4: 2845-2886. Heidelberg: Springer-Verlag, **2006**.

Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek, I., Thiel, E., und Emmerich, B. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonsmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93: 1732-1737, **1999**.

Hallek, M. und Wanders, L. Serum β 2-Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Progression-Free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma. *Leukemia and Lymphoma*, 22: 439-447, **1996**.

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G. und Stevenson, F. K. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94: 1848-1854, **1999**.

Hamburger, A. und Salmon, S. Primary bioassay of human tumor cells. *Science*, 54: 2475-2479, **1977**.

Han, T., Ezdinil, E. Z., Shimaoka, K. und Desai, D. V. Chlorambucil vs. combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 31: 502-508, **1973**.

Hansen, M. Chronic lymphocytic leukemia. Clinical studies based on 189 cases followed for a long time. *Scandinavian Journal of Haematology. Supplementum*, 18: 3-286, **1973**.

Hiddemann, W., Huber, H., Feuring-Buske, M., Lindner, L. und Bartram, C. Was ist Krebs? In: Schmoll, Höffken, and Possinger (Hrsg.), *Kompendium Internistische Onkologie*, Vol. 4. Heidelberg: Springer-Verlag, **2004**.

Hirschberger, J. Prinzipien der Chemotherapie beim Hund. *Tierärztliche Praxis*, 29(K): 20-24, **2001**.

Jain, N. C. Essentials of verterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, **1993**.

Jensen, K. und Schäfer, H. Statistische Modellbildung für Diagnosestudien. Vortrag von der 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Medizinische Informatik, Biochemie und Epidemiologie (GMDS) am 18.09.1996, Bonn. Erhalten am 10.10.2006 von www.meb.uni-bonn.de/gmds/abstracts/0353b.html, **1996** (letzte Änderung 08.07.1997).

Kalil, N. und Cheson, B. Chronic Lymphocytic Leukemia. *The Oncologist*, Vol. 4: 352-369, **1999**.

Kaspers, G.J., Pieters, R., Van Zantwijk, C.H., De Laat, P.A., De Waal, F.C., Van Wering, E.R. und Veerman, A.J. In vitro drug sentivity of normal peripheral blood lymphocytes and childhood leukaemic cells from bone marrow and peripheral blood. *British Journal of cancer*, 64: 469-474, **1991**

Kath, R., Blumenstengel, K., Fricke, H.J. und Hoffken, K. Bendamustine monotherapy in advanced and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Research Clinical Oncology*, 127: 48-54, **2001**.

Keating, M.J., O'Brien, S., Lerner, S., Koller, C., Beran, M., Robertson, L.E., Freireich, E.J., Estey, E. und Kantarjian, H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*, 92: 1165-1171, **1998**.

Keilholz, U., Knoth, H., und Sauer, H. Substanzprofile: Zytostatika, Hormone, Zytokine. In: Schmoll, Höffken, and Possinger (Hrsg.), *Kompendium Internistische Onkologie* Teil1, Vol. 4: 1547-1800. Heidelberg: Springer-Verlag, **2006**.

Kessler, M. 9.1 Prinzipien der Chemotherapie. In: M. Kessler (Hrsg.), *Kleintieronkologie*, Vol. 2: 113-119. Stuttgart: Parey in MVS Medizinverlage, **2005**.

Knauf, W. und Thiel, E. Chronische Lymphatische Leukämie. In: *Thiemes Innere Medizin TIM*. 1.Aufl. Stuttgart: Thime-Verlag, **1999**.

Kompetenznetz Maligne Lymphome. "Kiehl/WHO Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome." Einteilung der NHL; Erhalten am 30.06.2006 von www.lymphome.de/InfolympHOME/pathologieUndKlassifikation/KielKlassifikation/TabKielWHOKlass.jsp, **2002** (letzte Änderung: 05.10.2005).

Korte, W. und Cogliatti, S. Neues und Altes zur Chronischen Lymphatischen Leukämie. *Therapeutische Umschau*, Band 61: 151-156, **2004**.

Krober, A., Seiler, T., Brenner, A., Bullinger, L., Bruchle, E., Lichter, P., Döhner, H. und Stilgenbauer, S. V(H) mutation status, CD 38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100: 1410-1416, **2002**.

Kroker, R. Zytostatika. In: W. Löscher, F. Ungemach, and R. Kroker (Hrsg.), *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Vol. 4: 295-297. Berlin: Parey Buchverlag, **1999**.

Lee, J., Dixon, D., Kantarjian, H., Keating, M., und Talpaz, M. Prognosis of Chronic lymphocytic leukemia: A Multivariate regression Analysis of 325 Untreated Patients. *Blood*, 69: 929-936, **1987**.

Leifer, C. E. und Matus, R. E. Chronic lymphocytic leukemia in the dog: 22 cases (1974-84). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189: 214-217, **1986**.

Li, R., Hehlman, R., Sachs, R. und Duesberg, P. Chromosomal alterations cause the high rates and wide ranges of drug resistance in cancer cells. *Cancer Genetic and Cytogenetic*, 163: 44-56, **2005**.

Lissitchkov, T., Arnaudov, G., Peytchev, D. und Merkle, K. Phase-I/II study to elevate dose limiting toxicity, maximum tolerated dose, and tolerability of bendamustine HCL in pretreated patients with B-chronic lymphocytic leukemia (Binet stages B and C) requiring therapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*., 132: 99-104, **2006**.

Luqmani, Y. Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14: 35-48, **2005**.

Manhart, I.O., Messick, J., Kitchell, B., Schaeffer, D. und Shi, X. Quantitation of Canine Multidrug Resistance Gene1 (mdr1) Expression in Normal Lymph Nodes and de Novo Lymphoma using Competitive RT-PCR with a Standard Curve Methodology. *Genes, Dogs, and Cancer: Emerging Concepts in Molecular Diagnosis and Therapy*, URL: www.ivis.org: Document No. P0328.0501, **2001**.

Messmer, B.T., Messmer, D., Allen, S., Kolitz, J.E., Kudalkar, P., Cesar, D., Murphy, E.J., Koduru, P., Ferrarini, M., Zupo, S., Cutrona, G., Damle, R.N., Wasil, T., Rai, K.R., Hellerstein, M.K. und Chiorazzi, N. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 115: 755-764, **2005**.

Mischke, R., Hungerbühler, S. und Hönighaus, R. Chronische Lymphozytäre Leukämie beim Hund. *Praktischer Tierarzt*, 84: 86-96, **2003**.

Misdorp, W. 1.6 Epidemiologie von Krebserkrankungen bei Hunden und Katzen. In: M. Kessler (Hrsg.), *Kleintieronkologie*, Vol. 2: 14-15. Stuttgart: Parey-Verlag, **2005**.

Modiano, J., Breen, M. und Burnett, R. Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Research*, 65: 5654-5661, **2005**.

Molica, S., Brugiattelli, M., Callea, V., Morabito, F., Levato, D., Nobile, F. und Alberti, A. Comparison of younger versus older B-Cell chronic lymphocytic leukemia patients for clinical presentation and prognosis. A retrospective study of 53 cases. *European Journal of Haematology*, 52: 216-221, **1994**.

Montserrat, E., Sanchez-Bisoso, J., Vinolas, N. und Rozman, C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *British Journal of Haematology*, 62: 567-575, **1986**.

Nagel, M.-L. Komplikationen während und nach der Chemotherapie beim Hund. *Tierärztliche Praxis*, 31(K): 35-38, **2003**.

Neurohr, K. Kurzzeit-Chemosensibilitätstestung akuter Leukämien anhand des MTT-Assays und des Differential Staining Cytotoxicity Assays (DiSC) im Vergleich. Med. Dissertation, Universität zu Köln, **2003**.

Niederle, N. Phase III-Studie: Bendamustin vs. Fludarabin als 2nd-line Therapy der chronischen lymphatischen Leukämie im Stadium Binet B+C. Studienprotokoll, **2001**.

Oduncu, F. und Emmerich, B. Klinische Symptome, Komplikationen und Begleiterkrankungen. In: M. Hallek and B. Emmerich (Hrsg.), *Chronische Lymphatische Leukämie*. Bremen: UNI-MED Verlag, **2005**.

Pirker, R. Zytostatische Chemotherapie. In: W. Hiddemann, H. Huber, and C. Bartram (Hrsg.), *Die Onkologie* Teil 1: 399-424. Heidelberg: Springer-Verlag, **2004**.

Rai, K., Sawitsky, A., Cronkite, E., Chanana, A.D., Lavy, R.N. und Pasternack, B.S. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, Vol. 46: 219-234, **1975**.

Rai, K., Peterson, B.L., Appelbaum, F.R. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, Vol. 343: 1750-1757, **2000**.

Robert-Koch-Institut. Broschüre: Krebs in Deutschland (2002). 5. aktualisierte Ausgabe publiziert vom Robert-Koch-Institut und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Erhalten am 12.03.2006 von www.rki.de/cln_006/nn_226978/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuere/kid2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006, **2006**.

Roscher, K. Vergleich ausgewählter Blutparameter zur Eignung in der Diagnostik entzündlicher Erkrankungen beim Pferd. Dissertation: Justus-Liebig-Universität Gießen, **2000**.

Ruslander, D. Komplikationen der Chemotherapie. In: M. Kessler (Hrsg.), *Tieronkologie*, Vol. 2: 139-150. Stuttgart: Parey-Verlag, **2005**.

Schaefer, H. 6.4 Maligne Non-Hodgkin-Lymphome und Hodgkin-Lymphom. In: H. Löffler, J. Rasteller, and T. Haferlach (Hrsg.), *Atlas der klinischen Hämatologie*, 6. Auflage. Heidelberg: Springer Verlag, **2004**.

Schinköthe, T. Der Chemosensibilitätsindex Ci: eine neue Methodik zur Auswertung von in-vitro Chemosensibilitätstests bei akuten Leukämien: Dissertation, Universität zu Köln, **2001**.

Schinköthe, T. und Hallek, M. Diagnostik. In: M. Hallek and B. Emmerich (Hrsg.), *Chronische Lymphatische Leukämie*, Vol. 2. Auflage: 53-60. Bremen: UNI-MED Verlag, **2005**.

Schneider, R. Epidemiologic studies of cancer in man and animals sharing the same environment. Proceedings, *Third International Symposium on Detection and Prevention of Cancer*. New York City 1377-1387, **1976**.

SEER National Cancer Institute: Cancer Stat Fact Sheets: Incidence und Mortality: Chronic Lymphocytic Leukemia (2005). Erhalten am 12.03.2006 von <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html>, **2005**.

Silber, R., Degar, B., Costin, D., Newcomb, E.W., Mani, M., Rosenberg, C.R., Morse, L., Drygas, J.C., Canellakis, Z.N. und Potmesil, M. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine, and camptothecin analogs. *Blood*, 84: 3440-3446, **1994**.

Staib, P., Lathan, B., Schinköthe, T., Wiedenmann, S., Pantke, B., Diminski, T., Voliotis, D. und Diehl, V. Prognosis in adult AML is precisely predicted by the DiSC-assay using the chemosensitivity index Ci. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 457: 437 - 444, **1999**.

Staib, P. und Reiser, M. Chronische Lymphatische Leukämie. In: M. Classen, V. Diehl, and K. Kochsiek (Hrsg.), *Innere Medizin*, Vol. 6: 769-772. München: Urban & Fischer Verlag, **2004**.

Staib, P., Staltmeier, E., Neurohr, K., Cornely, O., Reiser, M. und Schinköthe, T. Prediction of individual response to chemotherapy in patients with acute myeloid leukaemia using the chemosensitivity index Ci. *British Journal of Haematology*, 128: 783-791, **2005**.

Stiene, S. Konturbasierte Objekterkennung aus Tiefenbildern eines 3D-Laserscanners; Masterarbeit, Universität Osnabrück. Erhalten am 01.10.06 von www.informatik.uni-osnabrueck.de/ssstiene/masterthesis/masterthesis.html, **2006**.

Sundman-Engberg, B., Tidefelt, U., Liliemark, J. und Paul, C. Intracellular concentrations of anti cancer drugs in leukemic cells in vitro vs in vivo. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 25: 252-256, **1990**.

Sundman-Engberg, B., Tidefelt, U., Gruber, A. und Paul, C. Intrazellulär Concentrations of mitoxantrone in leukemic cells in vitro vs in vivo. *Leukemia Research*, 17: 347-352, **1993**.

Sutter, N., Eberle, M., Parker, H., Pullar, B.J., Kirkness, E.F., Kruglyak, L. und Ostrander, E.A. Extensive and breed-specific linkage disequilibrium in *Canis familiaris*. *Genome Research*, 14: 2388-2396, **2004**.

Swerts, K., Moerloose, B. D., Dhooge, C., Laureys, G., Benoit, Y. und Philippe, J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Cancer*, 42: 295-309, **2006**.

Teske, E. Hämatopoietische Tumoren. In: M. Kessler (Hrsg.), *Kleintieronkologie*, Vol. 2: 477-505. Stuttgart: Parey-Verlag, **2005**.

Trümper, L., Möller, P. und Neubauer, A. Non-Hodgkin Lymphome. In: W. Hidemann, C. Bartram, and H. Huber (Hrsg.), *Lehrbuch der klinischen Onkologie*: Springer-Verlag, **2001**.

Vernau, W. und Moore, P. An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69: 145-164, **1999**.

Weisenthal, L., Marsden, J., Dill, P. und Macaluso, C. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Research*, 43: 749-757, **1983**.

Weisenthal, L. und Lippman, M. Cologenic and non-cologenic in vitro chemosensitivity assay. *Cancer Treatment Reports*, 69: 615-632, **1985**.

Werbing, V. Einfluss von Tumor-Stroma-Interaktionen auf das Chemoresistenzverhalten von Pankreaskarzinomzellen in vitro und in vivo. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen; Erhalten am 28.12.06 von URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2006/2967/>, **2006**

Workman, H. C. und Vernau, W. Chronic lymphocytic leukemia in dogs and cats: the veterinary perspective. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 33: 1379-1399, **2003**.

10. Anhang

Studiendaten:

Phase III-Studie:

Bendamustin vs. Fludarabin als 2nd-line Therapie der Chronischen Lymphatischen Leukämie im Stadium Binet B + C / Rai II – IV

Studienleitung:

Prof. Dr. N. Niederle
Medizinische Klinik III
Klinikum Leverkusen
Dhünnberg 60
53104 Leverkusen

Tel. 0214 / 13 – 2671/2672

Fax 0214 / 13 - 2198

Biostatistische Betreuung

und Randomisation:

Dr. Axel Hinke
WiSP Wissenschaftlicher Service Pharma GmbH
Karl-Benz-Str. 1
40764 Langenfeld

Tel. 02137 / 85313-0

Fax 02173 / 85313-11

Tab. 10.1: Flächen (AUC) und daraus errechnete C_i-Werte von Fludarabin und Bendamustin (siehe Kapitel 5.2)

Anzahl	AUC (Fludarabin)	C _i -Wert (Fludarabin)	AUC (Bendamustin)	C _i -Wert (Bendamustin)
1	409,1	0,8623051	2920,4	0,8872194
2	67,8	0,9757468	6859,4	0,7549808
3	76,9	0,9725366	2360,3	0,9078165
4	598,7	0,8050866	720,0	0,970929
5	1353,6	0,6125192	5761,1	0,7897331
6	25,5	0,9908082	8254,8	0,7130246
7	325,4	0,8888417	13138,3	0,5837164
8	1082,2	0,6757759	12639,8	0,595762
9	461,3	0,846158	9484,7	0,6779822
10	1636,6	0,5528564	8824,5	0,696573
11	291,7	0,8997553	16478,6	0,5090503
12	1541,3	0,5722689	6668,4	0,7609126
13	968,6	0,7041554	16822,9	0,5019193
14	330,7	0,8871374	5380,0	0,8021619
15	811,0	0,7455114	9432,0	0,6794478
16	1408,7	0,6004186	4038,7	0,8474824
17	139,9	0,9506003	7135,1	0,746500
18	2058,5	0,4745263	5857,0	0,7866359
19	2135,0	0,461561	5110,5	0,8110691
20	1914,1	0,500000	2297,8	0,9101444
21	3000,0	0,3374355	11531,6	0,6234381
22	2620,1	0,387202	2660,5	0,8967182
23	2323,4	0,4311213	3744,3	0,8577675
24	2910,3	0,3485763	7672,1	0,7302537
25	3174,2	0,3168067	22675,6	0,3948973
26			21653,2	0,411792
27			16916,4	0,500000
28			33832,9	0,249999

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz aus der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig Universität Gießen danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten.

Für die Gelegenheit, meine Dissertation an der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin des Klinikums der Universität zu Köln durchführen zu können, danke ich dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. M. Hallek.

Bei Dr. Peter Staib möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung der experimentellen Arbeiten in seinem Labor sowie für die konstruktive Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Timo Schinköthe für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit. Er hat mit seiner wissenschaftlichen Betreuung und wertvollen und kritischen Anregungen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik zu Köln, insbesondere Danuta Chrobok, danke ich für die wertvollen Hilfestellungen bei der Laborarbeit und ihre jederzeit gewährten Auskünfte.

Mein Dank geht an meine Freunde, speziell an meine Mädels, für ihre stets aufmunternde und motivierende Unterstützung und den Ansporn in Momenten des Zweifels. Zusätzlich danke ich denen, die mir für die Korrekturen tatkräftig zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, Hendrika und Gunter Lube, für ihren fortwährenden liebevollen Beistand und das entgegengebrachte Vertrauen, welche diese Arbeit erst ermöglicht haben. Meinem Bruder Jeroen danke ich für seine immergewährte Hilfe bei Computerfragen.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Rabea Lube

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5145-9



9 783835 195145 7